

**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ  
FAKULTA**  
Univerzita Karlova

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Karel Bouda

# **Studium excitonových interakcí ve světlosběrných komplexech**

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jan Alster, Ph.D.

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

Studijní obor: FBCHPE

Praha 2023



Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V ..... dne .....

Podpis autora





Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu Mgr. Janu Alsterovi, Ph.D. za jeho ochotu a trpělivost, kterou mi při psaní této práce věnoval. Dále Dr. rer. nat. Heiko Loksteinovi, Ph.D. za dodání vzorků intaktních fykobilizomů a také doc. RNDr. Jakubovi Pšenčíkovi, Ph.D. za pomoc při experimentech a konzultace.



Název práce: Studium excitonových interakcí ve světlosběrných komplexech

Autor: Karel Bouda

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jan Alster, Ph.D., Katedra chemické fyziky a optiky

Abstrakt: V rámci práce byla studována možná přítomnosti excitonové interakce ve fykobilizomech, tedy velkých pigment-proteinových světlosběrných komplexech vyskytujících se především u sinic. Ke studiu vzorků fykobilizomů sinice *thermosynechococcus elongatus* byla využita technika dvoudimenzionální elektronové spektroskopie, jež poskytuje rozlišení na femtosekundové škále a je citlivá na excitonové interakce. Ze získaných dat, měřených na spektrálním rozsahu přibližně 590 až 700 nm, byl sestaven možný model energetických hladin fykobilizomů a toku excitační energie mezi nimi. Data ukazují na pravděpodobnou přítomnost excitonové interakce mezi 3 dvojicemi elektronových stavů.

Klíčová slova: fykobilizomy, excitonová interakce, 2DES, *T. elongatus*

Title: Study of excitonic interactions in light harvesting complexes

Author: Karel Bouda

Department: Department of chemical physics and optics

Supervisor: Mgr. Jan Alster, Ph.D., Department of chemical physics and optics

Abstract: The thesis explores the possible presence of exciton interaction in phycobilisomes, the large pigment-protein light-harvesting complexes occurring mainly in cyanobacteria. The technique of two-dimensional electron spectroscopy, which provides a resolution on the femtosecond scale and is sensitive to exciton interactions, was used to study phycobilisomes of cyanobacteria *thermosynechococcus elongatus*. A possible model of energy levels of phycobilisomes and the flow of excitatory energy between them was constructed from the obtained data measured on the spectral range of approximately 590 to 700 nm. The data indicate the likely presence of exciton interaction between 3 pairs of electron states.

Keywords: phycobilisomes, exciton, 2DES, *T. elongatus*



# Obsah

Úvod	2
<b>1 Teoretický úvod</b>	<b>3</b>
1.1 Teoretický základ 2DES	3
1.1.1 Popis systému maticí hustoty	3
1.1.2 Generování signálu	4
1.1.3 Detekce signálu	6
1.2 Různé geometrie 2DES	7
1.3 Čtení 2D spekter	8
1.4 Heterodynní detekce	8
1.5 Globální analýza	9
<b>2 Vzorky - thermosynechococcus elongatus</b>	<b>11</b>
2.1 Fykobilizomy	11
2.2 Příprava vzorků	12
<b>3 Experimentální aparatura, postup měření a zpracování dat</b>	<b>13</b>
3.1 2DES aparatura	13
3.2 Další přístroje a kyvety	15
3.3 Postup zpracování dat	15
<b>4 Výsledky</b>	<b>17</b>
4.1 Data za pokojové teploty	20
4.1.1 Spektrální oblast 620 nm	20
4.1.2 Spektrální oblast 630 nm	23
4.1.3 Spektrální oblast 670 nm	25
4.2 Nízkoteplotní data	30
4.2.1 Spektrální oblast 630 nm	30
4.2.2 Spektrální oblast 675 nm	33
4.3 Shrnutí získaných dat	37
<b>5 Diskuze</b>	<b>39</b>
Závěr	44
Seznam použité literatury	45
<b>A Přílohy</b>	<b>47</b>
A.1 Simulace ramanových spekter	47

# Úvod

Je to pravděpodobně již více jak 2 miliardy let, kdy se organismy naučili zachytávat energii slunečního záření a ukládat jí ve formě chemické vazby, čili kdy získaly schopnost fotosyntézy. Ač je tato schopnost z evolučního hlediska velmi stará, stále všem aspektům fotosyntézy zcela nerozumíme a proto jsou fotosyntetické procesy, zejména ty primární, intenzivně studovány. Energie slunečního světla je nejprve zachycena světloběrnou anténou a následně předávána po směru energetického spádu do reakčního centra, kde dochází k rozdělení nábojů, čehož je později využito ke vzniku protonového gradientu na membráně, jež pohání tvorbu ATP. Od zachytu energie až po rozdělení nábojů hrají hlavní roli pigmenty, či pigment-proteinové komplexy. Pro zajištění toku excitační energie z místa jejího zachytu ve světloběrné anténě až do reakčního centra, je potřeba aby pigmenty ve fotosyntetickém aparátu měly vhodně položené energetické hladiny. Modifikace energetických hladin jednotlivých pigmentů je dosaženo díky různým vazbám jak mezi pigmenty samotnými, tak mezi pigmenty a proteinovým lešením. Jednou z důležitých interakcí posouvajících elektronové hladiny je excitonová interakce. Lze ji nalézt například u tzv. zvláštního páru chlorofylů, jež je srdcem reakčního centra, kde má zcela nezastupitelnou roli a umožňuje rozdělení náboje. Vzhledem k tomu, jak důležitou roli hraje excitonová interakce v reakčním centru, je jistě důležitou otázkou, v jakých dalších systémech se tato interakce vyskytuje. Proto je dnes výskyt a také mechanismus excitonové interakce předmětem řady experimentálních i teoretických studií.

V centru pozornosti při výzkumu fotosyntetických pochodů jsou v dnešní době především světloběrné antény a reakční centra a právě do této skupiny spadají fykobilizomy, což jsou velké pigment-proteinové komplexy, které zachycují energii slunečního záření a předávají ji do reakčního centra. Protože se fykobilizomy vyskytují především u sinic, o nichž se předpokládá, že jejich předci byly prvními organismy s oxigenní fotosyntézou, byly a jsou tyto pigment-proteinové komplexy detailně zkoumány. Až do nedávné doby však nebyl studován přenos energie ve fykobilizomech na femtosekundové škále<sup>1</sup> a proto je cílem této práce objasnit energetickou strukturu a tok energie ve fykobilizomech sinice *thermosynechococcus elongatus*.

Pro studium fykobilizomů byla zvolena technika dvoudimenzionální elektronové spektroskopie, protože poskytuje rozlišení ve femtosekundové škále a jedná se o techniku velice citlivou na přenosy energie. Umožňuje pozorování jednotlivých energetických hladin ve vzorku, toku energie mezi nimi a umožňuje rozeznávat excitonové interakce.

---

<sup>1</sup>V době zadávání této diplomové práce nebyl publikován žádný článek měření energetického přenosu ve fykobilizomech s femtosekundovým rozlišením, avšak v průběhu řešení práce byly opublikovány 2 články na toto téma. Oba tyto články se ovšem zabývají výzkumem fykobilizomů z jiných sinic, než je *thermosynechococcus elongatus*.

# 1. Teoretický úvod

Dvoudimenzionální elektronová spektroskopie (zkratka 2DES z anglického *two-dimensional electronic spectroscopy*) je spektroskopickou technikou poskytující vysoké časové i spektrální rozlišení zároveň. Základem techniky je využití tří laserových excitačních femtosekundových pulzů na vyvolání odezvy vzorku, tedy pro zjištění optické odezvy funkce třetího řádu  $S^{(3)}$ . Díky navzájem nezávisle laditelným časovým odstupům mezi excitačními pulzy lze pomocí 2DES efektivně studovat například přenos energie na femtosekundové škále, excitonové vazby, relaxační procesy elektronových stavů nebo vibrační stavy. Z těchto důvodů je metoda již od začátku 21. století užívána zejména pro studium světlosběrných komplexů, avšak v nynější době se objevuje její další aplikace, například ve výzkumu nanočástic a nanosystémů.[1, 2]

Metoda 2DES je využívána v několika různých geometriích, například *plně kolineární*, či naopak *plně nekolineární uspořádání* - podrobnosti o možných geometriích viz sekce 1.2.[3] Níže uvedená teorie se zaměřuje především na popis 2DES v kontextu plně nekolineární geometrie, která byla využívána v rámci této práce a dále proto bude pod zkratkou *2DES* rozuměna specificky *plně nekolineární heterodynní dvoudimenzionální elektronová spektroskopie*. Pro úplnost dodejme, že z hlediska matematického popisu představuje plně nekolineární uspořádání nejsložitější případ, tedy níže uvedené vztahy jsou vždy obecným tvarem, který se pro jiné geometrie často redukuje do jednodušší podoby.

## 1.1 Teoretický základ 2DES

### 1.1.1 Popis systému maticí hustoty

Popis biologických chromoforů je značně obtížný, protože typicky jde o systémy v kondenzovaném stavu (uvnitř proteinového lešení, v roztoku atd.) a tedy vykazují celou plejádu interakcí s okolím. Z tohoto důvodu se užívá statistického popisu prostřednictvím evoluce matice hustoty  $\rho$ . Element matice hustoty  $\rho_{i,j}$  pro systém s  $N$  stavy je dán vztahem

$$\rho_{ij} = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N c_{n,i} c_{n,j}^* |\psi_i\rangle \langle \psi_j|, \quad (1.1)$$

kde vystupují bázové vlnové vektory  $\psi_i$  a  $\psi_j$  a jejich koeficienty  $c_n$ . Diagonální členy matice hustoty  $\rho_{i,i}$  se nazývají *populace* a jak již napovídá název, mají význam pravděpodobnosti naměření systému ve stavu popsaného vlnovým vektorem  $|\psi_i\rangle$ . Excitace, či naopak vyzáření fotonu a další obdobné jevy vedou právě ke změně poměru velikostí mezi diagonálními členy. Mimodiagonální členy  $\rho_{i,j}$  (kde  $i \neq j$ ), tzv. *koherence*, nesou informaci o provázanosti jednotlivých diagonálních členů. Vlivem intermolekulárních a intramolekulárních interakcí se s vývojem systému v čase koherence typicky ztrácejí.[3]

Pro popis nelineárních optických jevů obecně (v kondenzované fázi) se využívá časově závislá poruchová metoda, kdy časově závislou matici hustoty  $\rho(t)$  rozděl-

lujeme na matici hustoty základního stavu  $\rho^{(0)}(-\infty)$  v rovnováze a na poruchové členy  $\rho^{(n)}(t)$ , čímž získáváme vztah

$$\rho(t) = \rho^{(0)}(-\infty) + \sum_{n=1}^{\infty} \rho^{(n)}(t), \quad (1.2)$$

kde suma představuje  $n$ -tou poruchu. Při časovém vývoji matice hustoty pak uvažujeme pouze vývoj poruchových členů. Poruchový hamiltonián  $H'(t)$  generující poruchové členy lze vyjádřit jako

$$H'(t) = \hat{\mu}E(t), \quad (1.3)$$

tedy pomocí operátoru přechodového dipólového momentu  $\hat{\mu}$  a klasického elektrického pole  $E(t)$ . V případě 2DES studujeme systém pomocí efektů odezvy třetího řádu (*third-order response*) a proto musíme pracovat s maticí hustoty také 3. řádu  $\rho^{(3)}(t)$ . Vypočteme-li stopu této matice skrze dipólový moment získáváme *polarizaci 3. řádu*  $P^{(3)}(t)$

$$P^{(3)}(t) = Tr\{\hat{\mu}\rho^{(3)}(t)\}, \quad (1.4)$$

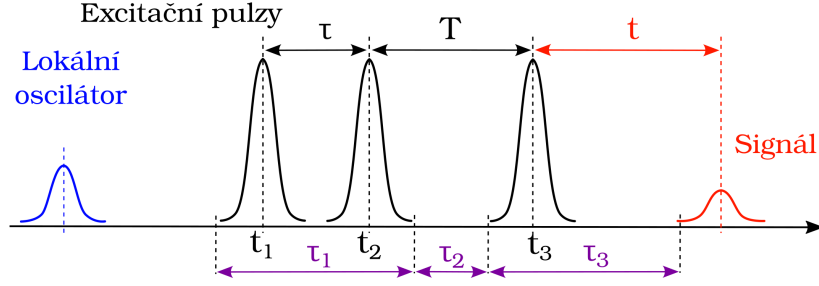
díky čemuž se dostáváme k popisu reakce systému na elektrické pole pomocí klasické veličiny, čehož budeme dále využívat.[3] Detailnější teoretický popis, který je nad rámec této experimentální práce, lze nalézt například v [4].

## 1.1.2 Generování signálu

Metoda 2DES využívá k vyvolání odezvy vzorků tří femtosekundových pulzů. První dva z nich slouží jako *pump* (čerpačící) pulzy a třetí jako *probe* (sonda). Pulzy vyvolávají odezvu vzorku, jež se projevuje jako signální pulz vycházející ze vzorku.[3] Prodlevy mezi excitačními pulzy jsou laditelné. Mezi prvním a druhým pulzem se zpoždění  $\tau$  nazývá *koherenční čas*, je jemně laditelné a jak bude ukázáno dále, díky jeho nastavování lze od sebe separovat data odpovídající různým excitačním frekvencím. Druhý a třetí pulz odděluje *populační čas*  $T$ . Populační časy mají velké rozpětí (desítky fs až stovky ps) a představují dobu, jež je systému ponechána na relaxaci.[1]

V oblasti vzorku dochází při dopadu prvního excitačního pulzu k interakci elektrického pole tohoto pulzu se vzorkem. Následně dochází k interakci změněného pole vzorku s druhým excitačním pulzem. Na excitovaný vzorek můžeme v tuto chvíli nahlížet jako na plejádu difrakčních mřížek (každý stav vzorku vytváří jednu mřížku), na niž (po určitém čase  $T$ , během kterého se systém vyvíjí) dochází k difrakci třetího pulzu, čímž vzniká měřitelný signál.[3] Detailní popis všech interakcí skrytých v právě uvedeném velmi stručném náhledu celé situace je nad rámec této práce, níže se omezíme pouze na souhrn majoritních efektů - pro bližší popis všech interakcí viz[4] či [5]. Pro snazší popis elektrického pole v oblasti vzorku zavedeme označení časů, kdy jednotlivé peaky vykazují maximální intenzitu:  $t_1$ ,  $t_2$  a  $t_3$  (označení časů viz obrázek č.1.1) a z praktických důvodů volíme  $t_3 = 0$  (signální pulz tak vždy vychází ze vzorku v kladném čase). S takto





Obrázek 1.1: Schéma pulzů užívaných v 2DES. Modrý pulz je lokální oscilátor, který slouží pro heterodynní detekci. Černé pulzy jsou excitační a mají mezi sebou nastavitelné časové zpoždění  $\tau$  (koherenční čas) a  $T$  (populační čas). Po dopadu všech 3 excitačních pulzů dochází k vyvolání odezvy v podobě signálního pulzu vycházejícího se zpožděním  $t$ . Protože k interakci pulzu se vzorkem může dojít kdykoliv pod jeho obálkou, definujeme časy  $\tau_i$ , jež tuto skutečnost vystihují.

zavedeným značením můžeme zapsat elektrické pole  $E_{int}(\mathbf{r}, \xi)$ , závislé na vzdálenosti  $\mathbf{r}$  od místa generace ve vzorku a na čase  $\xi$ , vznikající při dopadu pulzů do vzorku jako

$$\begin{aligned}
 E_{int}(\mathbf{r}, \xi) = & \tilde{A}(\xi - t_1)e^{-i\omega_0(\xi - t_1) + i\mathbf{k}_1 \cdot \mathbf{r}} + \tilde{A}(\xi - t_2)e^{-i\omega_0(\xi - t_2) + i\mathbf{k}_2 \cdot \mathbf{r}} \\
 & + \tilde{A}(\xi - t_3)e^{-i\omega_0(\xi - t_3) + i\mathbf{k}_3 \cdot \mathbf{r}} + \left( \tilde{A}(\xi - t_1)e^{-i\omega_0(\xi - t_1) + i\mathbf{k}_1 \cdot \mathbf{r}} \right. \\
 & \left. + \tilde{A}(\xi - t_2)e^{-i\omega_0(\xi - t_2) + i\mathbf{k}_2 \cdot \mathbf{r}} + \tilde{A}(\xi - t_3)e^{-i\omega_0(\xi - t_3) + i\mathbf{k}_3 \cdot \mathbf{r}} \right)^* .
 \end{aligned} \tag{1.5}$$

Ve vztahu vystupují amplitudy polí od jednotlivých pulzů  $\tilde{A}(\xi - t_i)$  a jejich vlnové vektory  $\mathbf{k}_i$ . Hvězdička označuje komplexně sdruženou část výrazu, jak je zvykem.[1] Vlnové vektory pulzů závisejí na použité geometrii - blíže viz sekce 1.2.

Elektrické pole na vzorku generuje skrze odezovou funkci systému  $S^{(3)}(t)$  změnu polarizace  $P^{(3)}(\mathbf{r}, t)$  dle vztahu

$$\begin{aligned}
 P^{(3)}(\mathbf{r}, t) = & \int_0^\infty \int_0^\infty \int_0^\infty S^{(3)}(\tau_1, \tau_2, \tau_3) E(\mathbf{r}, t - \tau_1 - \tau_2 - \tau_3) \\
 & \times E(\mathbf{r}, t - \tau_2 - \tau_3) E(\mathbf{r}, t - \tau_3) d\tau_1 d\tau_2 d\tau_3 ,
 \end{aligned} \tag{1.6}$$

ve kterém každý z členů elektrické intenzity odpovídá výrazu (1.5). Ve vztahu jsou použity místo časů  $t_i$ , časy  $\tau_i$  (definice viz obrázek č.1.1), protože pulzy užívané k vyvolání odezvy vzorku nejsou v reálném experimentu  $\delta$ -pulzy a k interakci se vzorkem tak může docházet v libovolném pořadí pulzů a z hlediska času kdykoliv pod obálkou pulzů. Dosazením elektrických intenzit (1.5) do právě uvedeného vztahu pro polarizaci vzniká celkem  $6^3$  tříčlenných činitelů dvojic amplitudy a fáze, které představují interakci vzorku s excitačními pulzy v jednom specifickém pořadí. Lze snadno nahlédnout, že vždy právě 6 těchto činitelů má stejnou kombinaci vlnových vektorů, díky čemuž jimi generovaný signál odchází ze vzorku ve specifickém směru daném vlnovým vektorem  $\mathbf{k} = \pm k_1 \pm k_2 \pm k_3$ . [1]

Různé kombinace vlnových vektorů určují různé tzv. *interakční dráhy* (*interaction pathway*), kterých je celkem  $2^3$ . V kontextu popisu 2DES signálů se však

typicky uvažují pouze dvě dráhy a sice *refázovací (RE)* a *nerefázovací (NRE)*. Pro přesnější popis je pak zapotřebí začlenit i dráhu odpovídající *druhému kvantování (DQ)* a dále generaci *třetí harmonické frekvence (THG)*, protože tyto interakční dráhy se projevují v datech v místě překryvu pulzů. Vlnové vektory pro všechny 4 interakční dráhy mají tvar

$$\begin{aligned}
\mathbf{k}_{RE} &= -\mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3, \\
\mathbf{k}_{NRE} &= \mathbf{k}_1 - \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3, \\
\mathbf{k}_{DQ} &= \mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 - \mathbf{k}_3, \\
\mathbf{k}_{THG} &= \mathbf{k}_1 + \mathbf{k}_2 + \mathbf{k}_3.
\end{aligned}
\tag{1.7}$$

Omezíme-li se na analýzu dat bez úvodních velmi krátkých populačních časů a oblasti koherenčního času kolem nuly, není nutné *DQ* a *THG* uvažovat, čehož se dále v této práci přidržíme.[3] Bližší rozbor všech interakčních drah viz [4].

### 1.1.3 Detekce signálu

Chování vzorku, který chceme pomocí 2DES studovat, je popsáno odezvovou funkcí třetího řádu  $S^{(3)}(t)$ , jež vystupuje ve vztahu (1.6), který popisuje změnu polarizace v oblasti vzorku. Z podoby zmíněného vztahu pro změnu polarizace je ovšem patrné, že funkci  $S^{(3)}(t)$  není možné prakticky získat. Můžeme zkoumat pouze změnu polarizace v oblasti vzorku, přičemž měření veličinou není polarizace ve vzorku, ale spektrum signálního pulzu dopadajícího na detektor, čili jeho elektrické pole. Musíme proto najít vztah mezi tímto elektrickým polem a polarizací vzorku a smířit se s faktem, že budeme zkoumat pouze změnu polarizace vzorku, jež je indukována odezvovou funkcí a ne odezvovou funkcí samotnou.

V průběhu 2DES experimentu jsou postupně nastavovány populační časy  $T$  a pro každý z nich je proměřen celý zvolený rozsah koherenčních časů  $\tau$ . Pomocí detektoru je pro každou kombinaci  $T$  a  $\tau$  snímáno spektrum pulzu signálu, tedy elektrické pole signálu v závislosti na frekvenci  $E_S(\omega_t)$ , přičemž je využívána heterodynní detekce pro zlepšení kvality signálu (blíže viz sekce 1.4). Složením všech získaných spekter pak získáváme informaci v podobě trojrozměrné matice  $E_S(\tau, T, \omega_t)$ , tedy jako funkci koherenčního času a spektra signálu pro každý měřený populační čas. Z Maxwellových rovnic plyne vztah mezi měřeným elektrickým polem signálu a polarizací  $P^{(3)}(\tau, T, \omega_t)$ , jež vzniká v oblasti vzorku, v podobě

$$E_s(\tau, T, \omega_t) \sim \frac{i\omega_t}{n(\omega_t)} P^{(3)}(\tau, T, \omega_t). \tag{1.8}$$

Ve vztahu vystupuje index lomu  $n(\omega_t)$ , jež je závislý na frekvenci detekovaného záření  $\omega_t$ , avšak tato závislost se ve 2DES často zanedbává s ohledem na spektrální šířku používaných laserových pulzů.[1] Detailnější informace o frekvenční závislosti indexu lomu ve viditelné oblasti viz [6].

S využitím právě uvedeného vztahu (1.8) lze z měřených dat získat polarizaci vzorku, přesněji výraz  $iP^{(3)}(\tau, T, \omega_t)$ . Fourierovou transformací tohoto výrazu vůči

koherenčnímu času  $\tau$  získáváme informaci o chování vzorku v podobě tzv. *korelačních spekter*

$$S_{2D}(\omega_\tau, T, \omega_t) = \int_{-\infty}^{\infty} iP^{(3)}(\tau, T, \omega_t) e^{i\omega_\tau \tau} d\tau, \quad (1.9)$$

která reprezentují chování vzorku. Z výrazu je zřejmé, že získaná funkce  $S_{2D}(\omega_\tau, T, \omega_t)$  je komplexní a získáváme tak reálné a imaginární spektrum pro každý měřený populační čas. [1]

Změřená korelační spektra  $S_{2D}(\omega_\tau, T, \omega_t)$  lze rozložit do řady komponent (viz metoda globální analýzy v sekci 1.5). Z hlediska kinetiky můžeme tyto komponenty dělit do dvou skupin, kdy první vykazuje neoscilující exponenciální pokles intenzity a druhá oscilující exponenciální pokles. Kinetika první skupiny signálů je dána řešením kinetických rovnic pro systém s navzájem paralelními relaxačními procesy, které dává reálnou exponenciálu. Z pohledu matice hustoty se jedná o signál čistých stavů. Druhá skupina, jejíž kinetika je dána komplexní exponenciálou, má původ v koherencích a osciluje tak s frekvencí odpovídajícím energetickému rozdílu čistých stavů, mezi nimiž je koherence. [7, 4]

## 1.2 Různé geometrie 2DES

2DES technika může být implementována v několika různých uspořádáních - kolineární (*collinear*), částečně kolineární (*partially collinear* nebo také *pump-probe*) a plně nekolineární (*non-collinear*) geometrie, které se často označuje jako *BOXCARS* geometrie.[3]

V kolineárním uspořádání dopadají všechny pulzy na vzorek ze stejného směru, tedy mají stejný vlnový vektor  $\vec{k}_i$  a se stejným vlnovým vektorem vystupuje i signál, jež cestuje ve směru pulzů a je proto překryt silným pozadím. Proto je tato geometrie většinou užívána pro měření fluorescence vzorku, jež se sbírá v kolmém směru. Výhodou kolineárního uspořádání je možnost přesně kontrolovat fázový posun mezi pulzy díky tomu, že pulzy procházejí shodnou dráhu - v případech ostatních dvou uspořádání je přesná kontrola fázového rozdílu pulzů složitá.[3]

Částečně kolineární uspořádání se vyznačuje oddělením čerpacích pulzů (pulzy 1 a 2) od sondovacího pulzu (pulz 3) v prostoru - čerpací pulzy dopadají na vzorek oba ze stejného směru, ale sondovací pulz z jiného. Signál je pak sbírán ve směru průchodu sondovacího pulzu. Díky rovnosti vlnových vektorů pulzu 1 a 2 je zajištěno správné nafázování získávaného 2DES spektra. Rovnost vlnových vektorů prvních dvou pulzů s sebou ale také nese nemožnost odlišení refázovací a nefázovací složky spektra.[3]

Plně nekolineární, neboli *BOXCARS* uspořádání, je technicky nejnáročnější, avšak poskytuje nejvíce informací o zkoumaném systému a proto se také jedná o nejčastěji užívanou geometrii 2DES. Všechny tři excitační pulzy a pulz lokálního oscilátoru, používaný k heterodynní detekci, dopadají na vzorek v jiném směru - každý pulz prochází jedním vrcholem myšleného kvádrů a dále po diagonále do

protilehlého rohu, přičemž uprostřed tohoto myšleného kvádru se nachází vzorek, odtud přezdívkou této geometrie *BOXCARS*. Signál je detekován ve směru pulzu lokálního oscilátoru, tedy žádný z excitačních pulzů nedopadá na detektor a metoda se proto označuje jako „bez pozadí“ (angl. *background free*). Další výhodou tohoto uspořádání je možnost měření fázovací a refázovací fáze signálu díky změně pulzů 1 a 2 v čase. Problémem *BOXCARS* uspořádání je udržení stability fáze všech pulzů a její určení, ke kterému je potřeba zvláštní měření (často pomocí pump-probe experimentu).[3]

### 1.3 Čtení 2D spekter

Spektra získaná metodou 2DES poskytují řadu informací o struktuře elektronových a vibračních hladin, přesněji o přechodech mezi nimi. Na vodorovné ose spekter bývá obvykle vynesena frekvence  $\omega_\tau$  a na svislé  $\omega_t$ , tedy vodorovnou osu chápeme jako excitační frekvenci a svislou jako detekční. Každý peak ve 2DES spektru tak představuje stav systému s energií určenou  $\omega_t$ . Intenzita peaku ve spektru odpovídá populaci daného stavu a velikosti dipólového momentu a jeho poloha na  $\omega_\tau$  dává informaci o tom, při jaké excitační frekvenci dochází ke změně populace tohoto stavu. Diagonální peaky ve 2DES spektrech ukazují na stavy vykazující energii přechodu ekvivalentní frekvenci  $\omega_t = \omega_\tau$ , tedy zobrazují „pouze“ samotné stavy. Mimodiagonální členy naproti tomu mohou mít původ v koherencích mezi stavy, nebo také ve změně populací stavů a jejich interpretace je tak složitější.[3]

Tvary jednotlivých peaků ve 2DES spektrech vzorku roztoku (nebo obecně v kondenzované fázi) jsou určeny především interakcí systému s lázní. Izolovaný systém teoreticky vykazuje ostré kruhové peaky, ovšem interakce s lázní způsobuje jejich deformaci, protože lázeň ovlivňuje strukturu energetických hladin částí systému se kterými je v kontaktu. Vlivem lázně dochází typicky k posunu excitovaných stavů více do červené oblasti, roztažení peaku ve smyslu osy  $\omega_t$  a samozřejmě i jeho protažení v diagonálním směru (nehomogenní rozšíření).[3] Analýzou tvaru peaků je tak možné získat informace o interakci mezi systémem a lázní - blíže viz [5].

### 1.4 Heterodynní detekce

Heterodynní detekce je technikou využívající mísení pulsu signálu s pulzem lokálního oscilátoru (dále *LO*) po dopadu na detektor, což umožňuje určení amplitudy a fáze elektrického pole i slabého signálu, či signálu překrytého šumem. Fotodetektor vykazuje výstupní proud, jež je úměrný optickému výkonu, který na něj dopadá, čili intenzitě elektrického pole vzniklé smíšením *LO* a signálu, z čehož lze při znalosti charakteristik pulzu *LO* zpět vypočítat podobu elektrického pole signálního pulzu.[8]

Na detektor je nejprve přiveden pulz lokálního oscilátoru, jež zde vytváří elektrické pole  $E_{LO}(t)$  v rovině detektoru, kde čas  $t$  je měřen od dopadu pulzu *LO* dále. Následně dopadá pulz signálu - elektrická vlna  $E_S$ . Pole s intenzitami  $E_{LO}$

a  $E_S$  spolu interagují a vytváří výsledné pole  $E_{det}$ . Omezíme-li se na harmonické rovinné vlny, což je aproximace pro 2D spektroskopii dostačující, můžeme kvadrát elektrického pole na detektoru vyjádřit výrazem

$$E_{det}^2(t) = [E_S \cos(\omega_S t + \varphi) + E_{LO} \cos(\omega_{LO} t)]^2, \quad (1.10)$$

v němž figurují frekvence obou elektrických polí a neznámý fázový posun signálu  $\varphi$  (ten je dán několika faktory, mezi něž se řadí i zpoždění pulzu). Vztah lze snadno upravit do podoby

$$E_{det}^2(t) = \frac{1}{2} E_S^2 [1 + \cos 2(\omega_S t + \varphi)] + \frac{1}{2} E_{LO}^2 [1 + \cos 2(\omega_{LO} t)] \\ + E_{LO} E_S \{ \cos [(\omega_S t + \varphi) + \omega_{LO} t] + \cos [(\omega_S t + \varphi) - \omega_{LO} t] \}. \quad (1.11)$$

Části členů obsahující dvojnásobné frekvence, můžeme při měření zanedbat, protože představují změny natolik rychlé, že je detektor není schopen zaznamenat (například světlo v červené oblasti 680 nm má frekvenci přibližně  $4,4 \cdot 10^{14}$  Hz). Výraz se tak redukuje na tvar

$$E_{det}^2(t) = \frac{1}{2} E_S^2 + \frac{1}{2} E_{LO}^2 + E_S E_{LO} \cos(\omega_{det} t + \varphi), \quad (1.12)$$

kde vystupuje frekvence  $\omega_{det}$  definovaná jako rozdíl frekvence LO a signálu. Za předpokladu, že pulz LO má známou frekvenci a amplitudu můžeme dle (1.12) dopočítat amplitudu a frekvenci signálu.[8]

## 1.5 Globální analýza

Metoda globální analýzy je způsob analyzování, často užívaný například ve spektroskopii, založený na předpokladu, že zkoumaný systém lze chápat jako směs, kdy jednotlivé její složky vykazují homogenní chování, v našem případě z hlediska spektroskopie. Celkové chování systému, tedy jeho spektrum, pak lze uvažovat jako součet spekter jednotlivých jeho složek. Globální analýza tak rozkládá původní spektrum systému do sumy subspekter. Každé subspektrum je vynásobeno vhodným kinetickým modelem, jež zastává funkci váhového faktoru a tedy nese informaci o koncentraci složky, jíž patří dané subspektrum, v systému.[9]

Klíčem k úspěšné interpretaci dat pomocí globální analýzy je zvolení vhodných modelů pro výpočet kinetiky jednotlivých složek. V souladu s teorií se volí exponenciální a oscilující exponenciální pokles (nutno podotknout, že tato volba je jistou idealizací). Spektra jsou konstruována pomocí dvou modelů a sice *DAS* (*decay-associated spectra*), v případě neoscilujících složek, a *CAS* (*coherence-associated spectra*) pro oscilující složky. Samotná korelační spektra systému  $S_{2D}(\omega_\tau, T, \omega_t)$ , která zachycují jeho chování, pak lze rozložit jako

$$S_{2D}(\omega_\tau, T, \omega_t) = \sum_m DAS_m(\omega_\tau, \omega_t) e^{-\frac{T}{\tau_m}} + \sum_n CAS_n(\omega_\tau, \omega_t) e^{-\frac{T}{\tau_n} - iT\omega_n}, \quad (1.13)$$

kde  $\tau_m$  a  $\tau_n$  představují doby života příslušného stavu<sup>1</sup> a  $\omega_n$  je úhlová frekvence daného signálu, vykazuje-li oscilace.[9, 10]

<sup>1</sup>Zde pozor na značení. Právě zavedená  $\tau_m$  a  $\tau_n$  jsou dobami života stavů, tedy nemají nic společného s  $\tau_i$  užívanými ve vztahu 1.6 pro označení časových rozestupů.

Při užití globální analýzy s modely DAS a CAS je potřeba mít na paměti, že tato metoda vykazuje i několik problémů. Jedním z nich je nemožnost přímého porovnání intenzity experimentálních dat a získaných DAS a CAS spekter, protože v rámci výpočtu dochází ke zkreslení intenzit. Problémem je také konečná délka excitačního pulzu, který pochopitelně není  $\delta$ -pulzem a signál z něj pocházející také zasahuje do měřeného spektra. Výše uvedený model je platný pouze pro oblast bez signálu ze samotného excitačního pulzu, tedy až pro populační časy přibližně 2 až  $3\times$  větší než je FWHM (z anglického *full width at half maximum*, neboli šířka v půlce maxima) excitačního pulzu, kde je signál pulzu dostatečně malý. Dále nelze s jistotou předpokládat, že každé získané DAS či CAS spektrum je opravdu spektrem jedné jediné složky systému, protože se může jednat i o lineární kombinaci spekter více složek, což je potřeba zohlednit při rozboru výsledků globální analýzy. Dále je také nutné uvažovat, že v systému mohou být složky s velmi blízkou dobou života, které globální analýza není schopna od sebe odlišit.

Jak bylo zmíněno výše, globální analýza nemusí být schopna odhalit všechny složky v systému. I tak lze ovšem o těchto „skrytých“ složkách získat informace. Fourierovou transformací reziduí, jež zbyla v datech po odečtení nafitovaných signálů, lze získat tzv. *oscilační mapy* [11], neboli 2D spektra složek zbylých v datech. Samozřejmě nedokážeme získat doby života těchto složek, ale i jejich spektra obsahují cenné informace.

## 2. Vzorky - *thermosynechococcus elongatus*

V rámci práce byly studovány fykobilizomy, tedy světlosběrné systémy vyskytující se především u sinic. Konkrétně se jednalo o fykobilizomy izolované ze sinice *thermosynechococcus elongatus* (dále *T. elongatus*).

Sinice *T. elongatus* je termofilním organismem, jež žije v horkých pramenech (optimální teplota pro její růst je 55°C). Objevena byla v jižním Japonsku v pramenech poblíž města Beppu. Není bez zajímavosti, že původně byla označena jako druh *synechococcus elongatus* (kmen BP-1) a až po provedení fylogenetické analýzy byla zařazena do nového rodu *thermosynechococcus*. [12]

Jedná se o obligátně fotoautotrofní organismus, jež je v zájmu výzkumu již několik let, protože je užíván jako modelový organismus pro výzkum fotosyntézy. Díky tomu se jedná o poměrně probádaný organismus - je znám kompletní genom a trojdimenzinální struktura fotosystému I a II, jež byla získána rentgenovou difrakcí na vykrytalizovaných fotosystémech. [12]

### 2.1 Fykobilizomy

Fykobilizomy jsou pigment-proteinové struktury, jež dosahující velikosti 7 až 15 MDa. Tyto velké struktury slouží jako světlosběrné komplexy, jež zachycenou energii předávají do reakčního centra (PSI či PSII) a lze je nalézt zejména u sinic, ale také například u ruduch. Díky své velikosti mohou představovat až 60% všech proteinů v buňce, přičemž na zachytávání energie slunečního záření se podílejí z 30 až 50%. [13] Kromě světlosběrné funkce hrají fykobilizomy také důležitou roli v období, kdy se buňka nachází v nepříznivých podmínkách, protože slouží jako nouzový zdroj uhlíku, dusíku a síry. [14]

Zajímavou vlastností fykobilizomů je jejich různorodost ve struktuře a také ve velikosti. Obecně se fykobilizom skládá z *jádra* a *tyčí*<sup>1</sup>. Základem jádra jsou válečky tvořené diskovitými trimery allofykocyaninu, přičemž jádro může být tvořeno 2 až 3 válečky obsahujícími 4 trimerové disky, případně může mít ještě 2 další válečky, každý tvořený pouze dvěma trimerovými disky. Tyče jsou tvořeny opět disky, které ovšem namísto allofykocyaninu obsahují fykoerithrin a fykocyanin, jejichž poměr je velice variabilní. Jak jádro, tak tyče jsou tedy tvořeny z válečků, přičemž válečky v tyčích jsou orientovány kolmo na válečky v jádru. Na základě počtu válečků v jádře a počtu tyčí se rozlišují tři různé typy fykobilizomů. [13]

Struktura fykobilizomů *T. elongatus* jako celku dosud nebyla publikována<sup>2</sup>, ale pravděpodobně mají stejné uspořádání jako *synechococcus*, tedy tri-cylindrické

<sup>1</sup>V anglické literatuře se obvykle užívá výraz *rods*, který zatím v češtině pravděpodobně nemá ustanovený ekvivalent. Zde tedy zavádíme výraz *tyče*, který asi nejlépe popisuje originální význam.

<sup>2</sup>Je známa struktura alofykocyaninu - viz [15].

jádro na něž jsou připojeny tyče tvořené barvivy fykoeritrimem a fykocyaninem. [16]

## 2.2 Příprava vzorků

Intaktní fykoblizomy pro měření dodal Dr. rer. nat. Heiko Lokstein, Ph.D. Buňky *T. elongatus* byly kultivovány při 56°C a pH 7,8. Kultivace probíhala 7 dní až na konečné OD 1,3. Ze sklizených buněk byl, pomocí extrakce detailně popsané v [17], získán supernatant obsahující řadu proteinových komplexů včetně fotosytému II a intaktních fykobilizomů. Z tohoto supernatantu byly fykobilizomy izolovány centrifugací na přístroji *Centricon 100 k*. Fykobilizomy byly uchovávány (i měřeny) v pufru s pH 7,8 (složení: 100 mM Tricine, 300 mM MgCl<sub>2</sub>).

Vzorky pro měření byly připravovány ze zásobního roztoku jeho naředěním výše zmíněným pufrům na OD přibližně 0,3 v 0,5 mm. V případě nízkoteplotních experimentů (77 K) byly nejprve připraveny koncentrované zásobní vzorky (3× koncentrovanější než vzorky pro pokojovou teplotu), jež byly uchovávány v lednici. Před měřením bylo vždy 33  $\mu$ l tohoto roztoku naředěno 66  $\mu$ l glycerolu (Sigma-Aldrich, čistota  $\geq 99,5\%$ ).

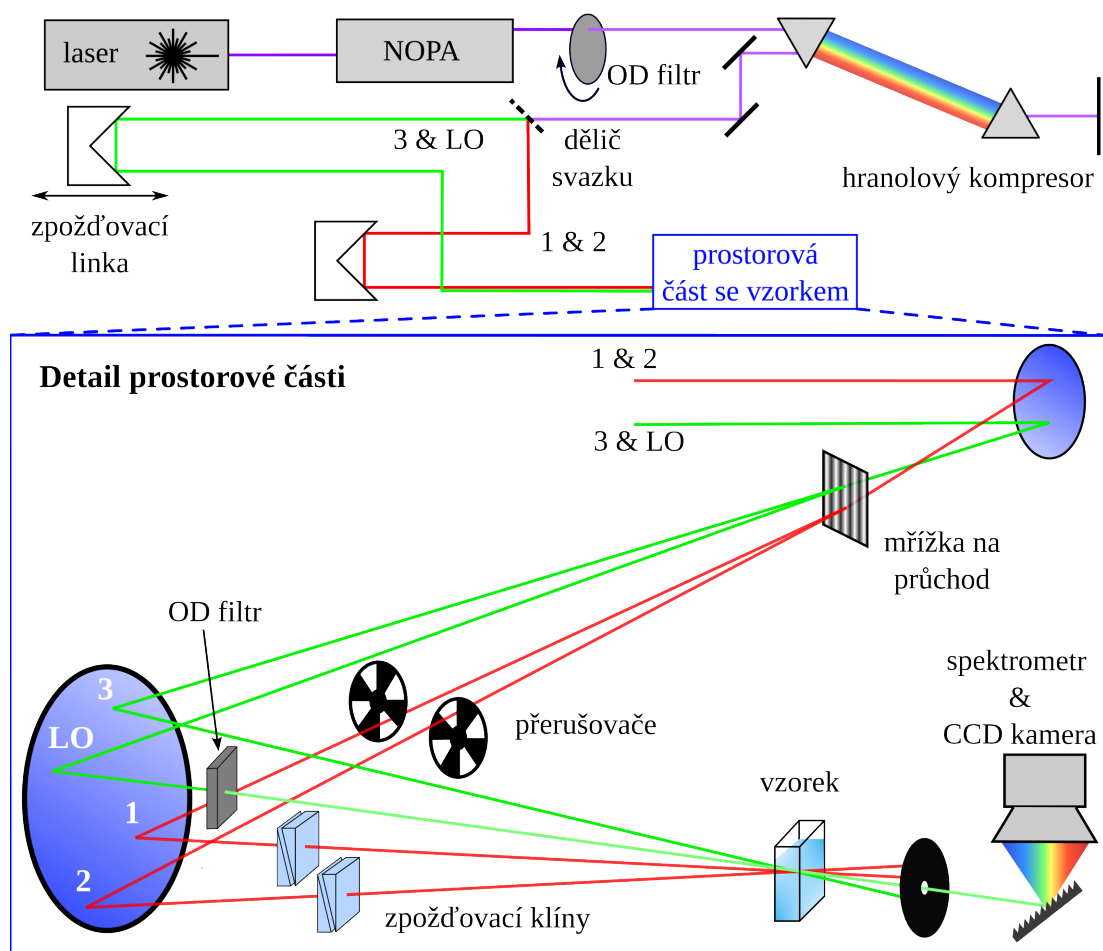


# 3. Experimentální aparatura, postup měření a zpracování dat

## 3.1 2DES aparatura

Experimentální 2DES aparatura využívaná v rámci práce byla postavena v plně nekolineárním uspořádání s využitím difrakční optiky pro docílení inherentní fázové stabilizace. Schéma aparatury je na obrázku č. 3.1. Světelné pulzy generované laserem PHAROS-6W (Light Conversion) byly vedeny do nekolineárního optického parametrického zesilovače (zkráceně *nopa* z anglického *noncollinear optical parametric amplifier*), kde docházelo ke generaci širokospektrálního a časově úzkého pulzu. V rámci práce byly využívány dvě různé nopy pro různé spektrální oblasti - pro měření v oblastech 620 a 630 nm byla využívána nopa ORPHEUS-N-3H a pro měření v oblasti 670 nm nopa ORPHEUS-N-2H, obě od výrobce Light Conversion. Za nopou procházel svazek OD filtrem umožňujícím regulovat jeho intenzitu a vstupoval do hranolového kompresoru s jehož pomocí byla kompenzována disperze optických elementů nacházejících se v další dráze svazku. Následně byl svazek na děliči svazku rozdělen na dvě větve - první sloužící jako třetí excitační pulz a pulz lokálního oscilátoru ( $3$  &  $LO$ ) a druhou, ze které se poté stává první a druhý excitační pulz ( $1$  &  $2$ ). Oba svazky procházely přes reflektory, přičemž reflektor umístěn v dráze  $3$  &  $LO$  byl vybaven elektrickým posunem a sloužil jako zpožďovací linka. Dále oba svazky dopadaly na sférické zrcadlo, které je fokusovalo na difrakční mřížku na průchod. Za mřížkou byla sbírána první maxima, čímž bylo docíleno rozštěpení svazku  $1$  &  $2$  na samostatné svazky  $1$  a  $2$  a stejně tak byl rozdělen svazek  $3$  &  $LO$ . Všechny 4 vzniklé svazky následně dopadaly na druhé sférické zrcadlo, přičemž svazky  $1$ ,  $2$  a  $3$  ještě před dopadem na zrcadlo procházely skrze optické přerušovače (jeden přerušoval svazek  $2$ , druhý svazky  $1$  a  $3$ ). Na zrcadlo byly svazky navedeny tak, aby dopadaly do vrcholů pomyslného čtverce a po odrazu se protínaly všechny čtyři v jednom bodě prostoru, kde byl umístěn vzorek, tedy v BOXCARS geometrii. Pulz  $LO$ , sloužící k heterodynní detekci, ještě před dopadem na vzorek procházel silným OD filtrem, aby bylo zajištěno, že nevyvolá výrazné změny ve vzorku a neovlivní tak měření. Za vzorkem byla umístěna clona (v podobě irisové clony), kterou procházely dále pouze svazky  $LO$  a signálu, všechny excitační svazky zde byly zachyceny. Svazky  $LO$  a signálu byly po průchodu clonou navedeny do mřížkového spektrometru (Iso Plane 160 výrobce Princeton Instruments) a rozmetené spektrum bylo snímáno CCD kamerou (ProEm+ 1600<sup>2</sup> eXelon3, taktéž od Princeton Instruments).

Populační čas (časový rozestup druhého a třetího excitačního pulzu) byl nastaven pomocí zpožďovací linky (M-406.6DG delay line od výrobce Physik Instrumente) umožňující velké posuny a tedy poskytující velký rozsah časů (od jednotek fs do zhruba 1,5 ns). Koherenční čas (rozestup mezi prvními dvěma excitačními pulzy) byl nastaven pomocí dvou dvojic křemenných klínů, jež byly v dráze svazků  $1$  a  $2$  umístěny mezi druhým sférickým zrcadlem a vzorkem. Vždy jeden z dvojice klínů byl upevněn na elektrickém posunu (M-112.1DG delay line od výrobce Physik Instrumente). Toto uspořádání umožňovalo nastavení koheren-



Obrázek 3.1: Schéma experimentální aparatury. V horní části se nachází přehledové schéma části aparatury, kde jsou generovány pulzy. Dolní část (v modrém ohraničení) zachycuje detailní pohled na oblast se vzorkem.

ních časů s více než femtosekundovou přesností a v případě potřeby až v rozsahu 700 fs. Díky tomu, že každý ze svazků procházel vždy dvojicí protistojných klínů nedocházelo ke změně směru jeho vlnového vektoru - drobné vlivy způsobené nedokonalostí tvaru křemenných klínů byly kompenzovány kalibračním měřením.

Energie laserového svazku dopadající na vzorek byla laděna pomocí OD filtru umístěného před optickým kompresorem a to tak, aby v případě dat za pokojové teploty vždy odpovídala hodnotě 5 nJ v pulzu (tedy v případě užití aparatury výkonu  $1,24 \mu\text{W}$ ). Při měření za nízké teploty nebylo možné nastavit výkon laseru přesně, protože nebylo možné měřit výkon svazků uvnitř kryostatu. Na základě měření propustnosti kryostatu pro laserový svazek byla odhadnuta hodnota výkonu tak, aby odpovídal energii 5 nJ v pulzu, stejně jako u dat za pokojové teploty, avšak toto nastavení nebylo přesné.

Spektrum laserového pulzu bylo měřeno pomocí CCD kamery prostřednictvím měření pulzu LO, který procházel prázdným vzorkovým prostorem. Pro určování šířky pulzu byla využívána metoda autokorelace, přičemž měření probíhalo za pomoci pulzů 1 a 3. Naměřené hodnoty byly fitovány a z fitu byla získána hodnota

*FWHM*, tedy šířka pulzu v polovině jeho výšky. Dále udávané hodnoty *FWHM* jsou hodnoty získané přímo z autokorelace, nejedná se o přepočítání na skutečnou šířku pulzu.

## 3.2 Další přístroje a kyvety

Všechna provedená měření probíhala v SUPRASIL kyvetě s optickou dráhou 0,5 mm, jež se skládala ze dvou sklíček, kdy jedno bylo ploché a druhé bylo opatřeno výřezem. Ukázalo se, že při dlouhých 2DES měření část vzorku pomalu vytékala z kyvety<sup>1</sup> a proto byla každá kyveta se vzorkem, pro měření při pokojové teplotě, vždy po obvodu utěsněna několika vrstvami parafilmu. Měření za nízkých teplot (77 K) probíhalo v kryostatu Optistat DN2 (výrobce Oxford Instruments).

Absorpční spektra fykobilizomů za pokojové teploty (vzorků s glycerolem i bez něj) byla měřena pomocí spektrometru Specord 250 od výrobce Analytik Jena. Nízkoteplotní absorpční spektra byla získána za pomoci 2DES aparatury - vždy byla změřena intenzita LO na CCD kameře při průchodu prázdným kryostatem a kryostatem se vzorkem a z této dvojice pak bylo vypočteno absorpční spektrum<sup>2</sup>.

## 3.3 Postup zpracování dat

Surová data získaná z 2DES mají podobu řady spekter, jež mají na jedné ose koherenční čas  $\tau$  a na druhé frekvenci  $\omega_t$ , tedy prakticky jde o 1D spektra v každém koherenčním čase. Pro získání finálních korelačních spekter je tak nutné data nejprve v několika krocích zpracovat. Nejdříve byla provedena Fourierova transformace podél  $\omega_t$ , čímž byla získána časová osa  $t$  představující relativní zpoždění dvou pulzů. Z takto transformovaných dat byla zjištěna oblast obsahující signál (tzv. heterodynní okno) na základně vztahu (1.12) pro heterodynní detekci, kdy zmíněný vztah je uveden pro konkrétní  $\tau$  a  $T$ . Následně byla data Fourierovou transformací převedena do frekvenční domény v obou osách, přičemž při první transformaci byl od dat oddělen signál lokálního oscilátoru oknovou funkcí zvolenou na základně zjištěného heterodynní okna. Získaná 2D spektra byla následně oříznuta dle šířky spektra excitačního laseru, aby byly odstraněny signály, jež mají původ v rozptylu excitačních pulzů.

Získaný soubor korelačních spekter v různých populačních časech byl podroben globální analýze - viz vztah (1.13). Vzhledem k tomu, že pro populační časy kolem nuly obsahují data získaná měřením nejen signál vzorku ve smyslu reakce na excitaci, ale také koherentní artefakt (signál z rozpouštědla a kyvety, ve které je vzorek uzavřen - pro bližší popis této problematiky viz [10]), byla vždy analyzována data až od přibližně 40 fs dále. Výstupem globální analýzy byl seznam

---

<sup>1</sup>Je zajímavé, že k vytékání vzorku docházelo až po několika hodinách měření a za dalších několik hodin samovolně ustalo. Tento částečně vyschlý vzorek pak naopak způsobil velmi pevné spojení obou sklíček kyvety (pravděpodobně zde vznikl podtlak) a pro jejich oddělení bylo nutné nechat kyvetu odmočit v roztoku Hellmanex.

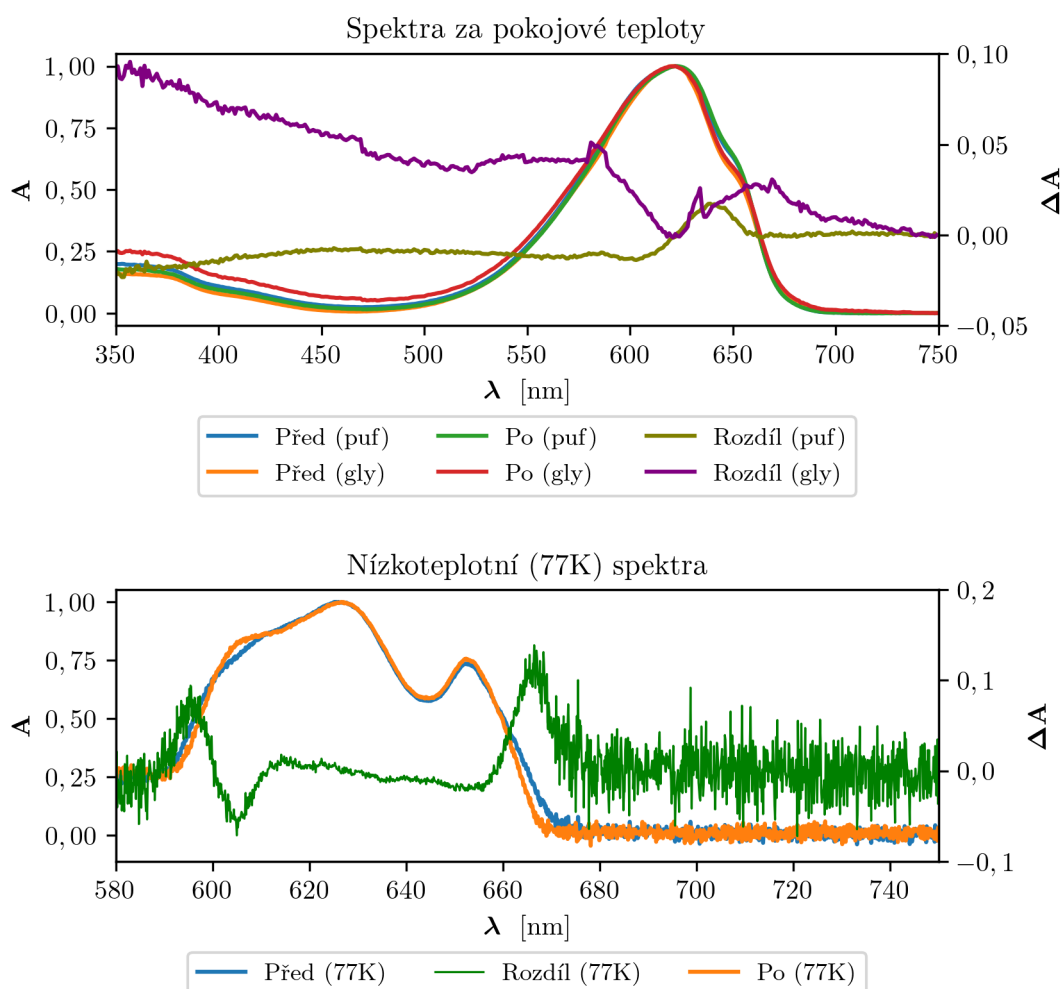
<sup>2</sup>Tato metoda bohužel není dokonalá a může mírně zkreslovat získaná spektra, protože referenční měření je pouze prázdný kryostat, tzn. bez kyvety.

jednotlivých komponent s jejich dobami života, spektry DAS či CAS a v případě oscilujících komponent i frekvence oscilací. Tyto údaje pak sloužily jako podklad pro analýzu možné podoby energetického schématu studovaného systému.

## 4. Výsledky

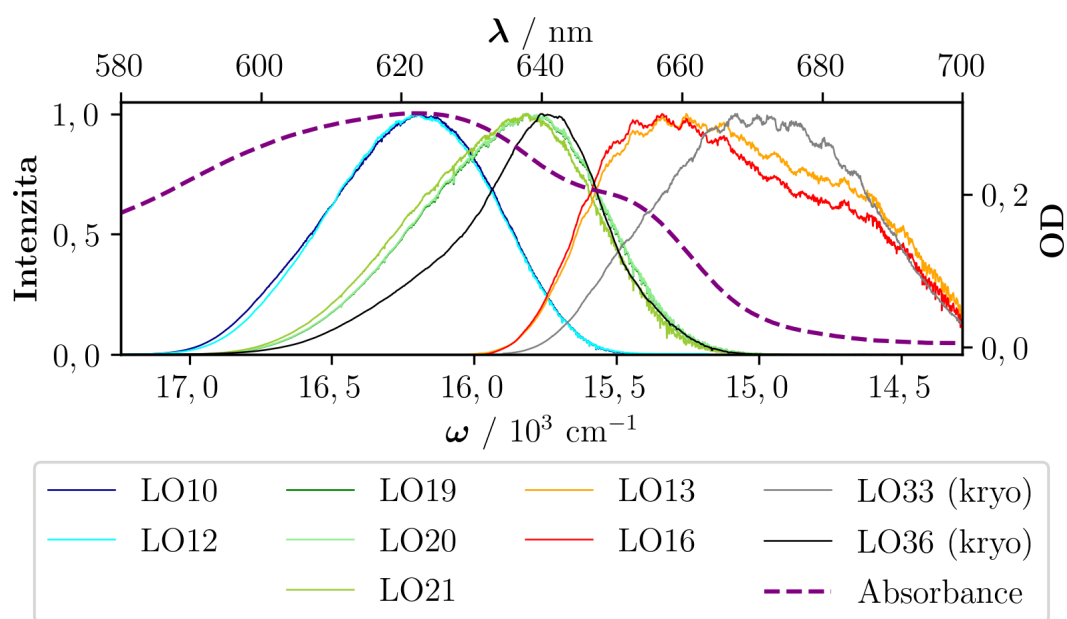
Kapitola je rozčleněna do tří částí. V první části jsou detailně popsána data získaná při pokojové teplotě a ve druhé při teplotě kapalného dusíku. Obě části jsou dále děleny do sekcí dle centrální vlnové délky spektra laseru s nímž bylo měřeno. Třetí část obsahuje přehled důležitých vlastností napříč všemi datovými sadami.

Měření 2DES by nemělo způsobovat trvalé změny vzorku a proto byla měřena absorpční spektra (blíže o technice měření absorpčních spekter viz sekce 3.2) před a po 2DES experimentech. Ukázkou získaných spekter zachycuje obrázek 4.1. Spektrum čistého vzorku fykobilizomů vykazuje změny do cca 2%. V případě vzorku s glycerolem měřeným za pokojové teploty a za nízké teploty se změna absorbance pohybuje okolo 10%.



Obrázek 4.1: Normovaná absorpční spektra zkoumaných vzorků. Data označená *puf* jsou fykobilizomy v pufru, *gly* značí fykobilizomy ředěné glycerolem a *77K* fykobilizomy ředěné glycerolem, které byly měřeny za teploty kapalného dusíku v kryostat. Na levých osách je vynesena absorbance, na pravé rozdíl absorbance vzorku po a před měření.

V rámci experimentů byla zkoumaná spektrální oblast v rozsahu zhruba 580 až 700nm, kdy tato oblast byla vybrána s ohledem na podobu absorpčního spektra fykobilizomů. Vzhledem k technickým možnostem nastavení spektrální šířky laserových pulzů byla nutné přistoupit k proměřování celého spektrálního rozsahu postupně. Při pokojové teplotě byla provedena měření při třech různých nastaveních spektra laserového pulzu - na 620, 630 a 670 nm (vlnová délka označuje přibližně střed spektra). V případě nízkoteplotních dat bylo měřeno za dvou různých nastavení a sice 630 a 675 nm. Porovnání absorpčního spektra fykobilizomů a spekter lokálních oscilátorů, tedy užívaných laserových pulzů, je zachyceno na obrázku 4.2. Jednotlivé čáry představují spektra LO jednotlivých experimentů (byla využívána automatizace experimentu a v rámci jednoho experimentu byly typicky měřeny dvě datové sady ihned po sobě). Pro různé spektrální oblasti měl laserový svazek nejen odlišné spektrum, ale také časový průběh - parametr FWHM (šířka v půlce maxima) se pohyboval od 29 fs (nízkoteplotní data na 670 nm a data za pokojové teploty v oblasti 670 nm), přes 33 fs (data kolem 620 nm) a 36 fs (nízkoteplotní data na 630 nm) po 38 fs pro data ve spektrálním rozsahu v okolí 630 nm. Důvodem značného rozdílu v FWHM mezi datovými sadami bylo především využívání jiné NOPy pro oblast 670 a 620-630 nm.



Obrázek 4.2: Přehled spekter lokálních oscilátorů<sup>2</sup> pro jednotlivé experimenty (vyneseny na levou svislou osu) a absorpčního spektra fykobilizomů (pravá svislá osa). Datové sady jsou barevně odlišeny, aby bylo lépe čitelné, jaké byly měřené pro stejné spektrální nastavení laseru. Všechny intenzitní spektra jsou normována na hodnotu jedna.

Rozsah koherenčních časů pro měření za pokojové teploty činil přibližně -100 až 100 fs, v případě nízkoteplotních dat pak od -100 až do 200 fs. Krok koherenčního

<sup>2</sup>Čísla za lokálními oscilátory jsou pouze interním značením datasetů v rámci měření, do kterého jsou zahrnuty i různá kalibrační a zkušební měření, proto mají některé datasety tak vysoká čísla i přesto, že experimentů bylo provedeno značně méně.

času byl volen na základě vhodného podvzorkování, aby bylo dosaženo co nejkratší možné doby experimentu (detaily o podvzorkování viz [18]) a pohyboval se mezi 5,2 a 6,9 fs. Populační časy byly měřeny pro oba typy dat vždy od -80 fs do 200 ps, přičemž v krátkých časech byla data zaznamenávána s krátkým krokem, aby bylo možné dobře zachytit signály s kratšími dobami života, a pro delší časy byl krok prodlužován. K nastavení různé délky kroku populačního času bylo nutno přistoupit z čistě praktických důvodů a sice kvůli délce měření (jedna sada dat za pokojové teploty byla měřena cca 6 hodin, zatímco za nízké teploty přibližně 12 hodin).

V rámci práce byla prováděna jak 2DES měření, tak měření *pump-probe* (v překladu metoda excitace a sondování), jež mělo sloužit pro přesné nafázování signálu. Bohužel se ukázalo, že tato technika není v naší laboratoři po technické stránce ještě zcela dotažena a data po nafázování vykazují nekonzistenci v rámci různých datových sad. I přesto, že rozdíl spekter laseru byl mezi jednotlivými datovými sadami byl velmi malý a shoda projekce 2DES spekter s *pump-probe* měřeními byla srovnatelná pro různé datové sady, výsledné fázování se poměrně silně lišilo. Z tohoto důvodu jsou níže prezentována pouze amplitudová spektra, protože odlišnost fázování signálu mezi jednotlivými datovými sadami znamená různé rozdělení intenzity signálu mezi reálnou a imaginární část. Dále si lze na grafech níže povšimnout nedokonalé separace refázovací a nerefázovací složky signálu. Tento defekt je způsoben konečnou délkou pulzu (a také krátkou dobou života koherencí, blíže viz kapitola 5) a tedy praktickou nemožností obě složky dokonale oddělit.

## Popis dále užívaných grafů

Veškeré níže uvedené 2D grafy zachycují pro lepší čitelnost interpolovaná data. K interpolaci byla využita bilineární metoda, originální data mají rozlišení cca od 100 do 270  $\text{cm}^{-1}/\text{px}$  ( $\text{px}$  značí pixel) v případě osy  $\omega_\tau$  a od přibližně 40 až 65  $\text{cm}^{-1}/\text{px}$  v ose  $\omega_t$ . Všechny grafy uvnitř jednoho obrázku mají společnou relativní intenzitní škálu (je uvedena v procentech a data v každém grafu jsou naškálována na celou tuto škálu), jež je vždy zakreslena dole. U každého grafu je pak vynesena hodnota maximální intenzity, aby bylo možné grafy porovnat mezi sebou. V datech jsou také zaneseny kontury, jež jsou vyznačené i v intenzitních škálách, aby bylo možné odečíst na jaké intenzitě se nacházejí. Grafy jsou vždy uspořádány do dvou sloupců, kdy, není-li řečeno jinak, tak v levém jsou refázovací a v pravém nerefázovací spektra. Každý graf obsahuje popisek s dobou života a případně i frekvencí zobrazeného signálu. Dále jsou v datech zanesena zeleně spektra lokálního oscilátoru, která slouží pro rychlou orientaci v jaké spektrální oblasti byla data získána<sup>3</sup> a jsou proto vyhlazena. V každém grafu je také černou čerchovanou čarou vynesena diagonála, případně černou přerušovanou čarou diagonály posunutá o 200, -200 a -500  $\text{cm}^{-1}$ .

<sup>3</sup>Ve skutečnosti je situace o něco složitější - v místech spektra, kde je intenzita LO slabá jsou nutně slabé i získávané signály. Některé stavy tak mohou mít silně potlačený signál. Proto je nutné znát přibližnou podobu spektra LO, aby bylo možné odhadnout, jak moc jsou data na prohlíženém úseku spektra důvěryhodná.

## 4.1 Data za pokojové teploty

### 4.1.1 Spektrální oblast 620 nm

Ve spektrální oblasti se středem na 620 nm byly naměřeny celkem 4 datové sady ve dvou experimentech - viz křivky LO10 a LO12 na obrázku 4.2. Globální analýzou byla ve všech datových sadách odhalena přítomnost 4 shodných neoscilujících komponent a 3 navzájem podobných oscilujících komponent. Pro tyto komponenty byla vypočtena průměrná doba života a v případě oscilujících i průměrná frekvence oscilace. Hodnoty společně s jejich nejistotami (vypočtenými jako směrodatné odchylky) byly zaneseny do tabulky 4.1. Z ní je jasně patrné, že relativní hodnota nejistoty určení doby života neoscilujících komponent značně roste pro delší dobu života. Déle žijící komponenty tedy mají dobu život určenou s větší nepřesností, přičemž je velmi důležité přihlídnout k faktu, že měření probíhalo do 200 ps a nejdelší určená doba života tuto hodnotu značně překračuje. Není tak jisté, zda chyba určení nejdelší komponenty není ve skutečnosti ještě mnohem vyšší, nebo zda-li není komponent žijících déle než 200 ps i více.

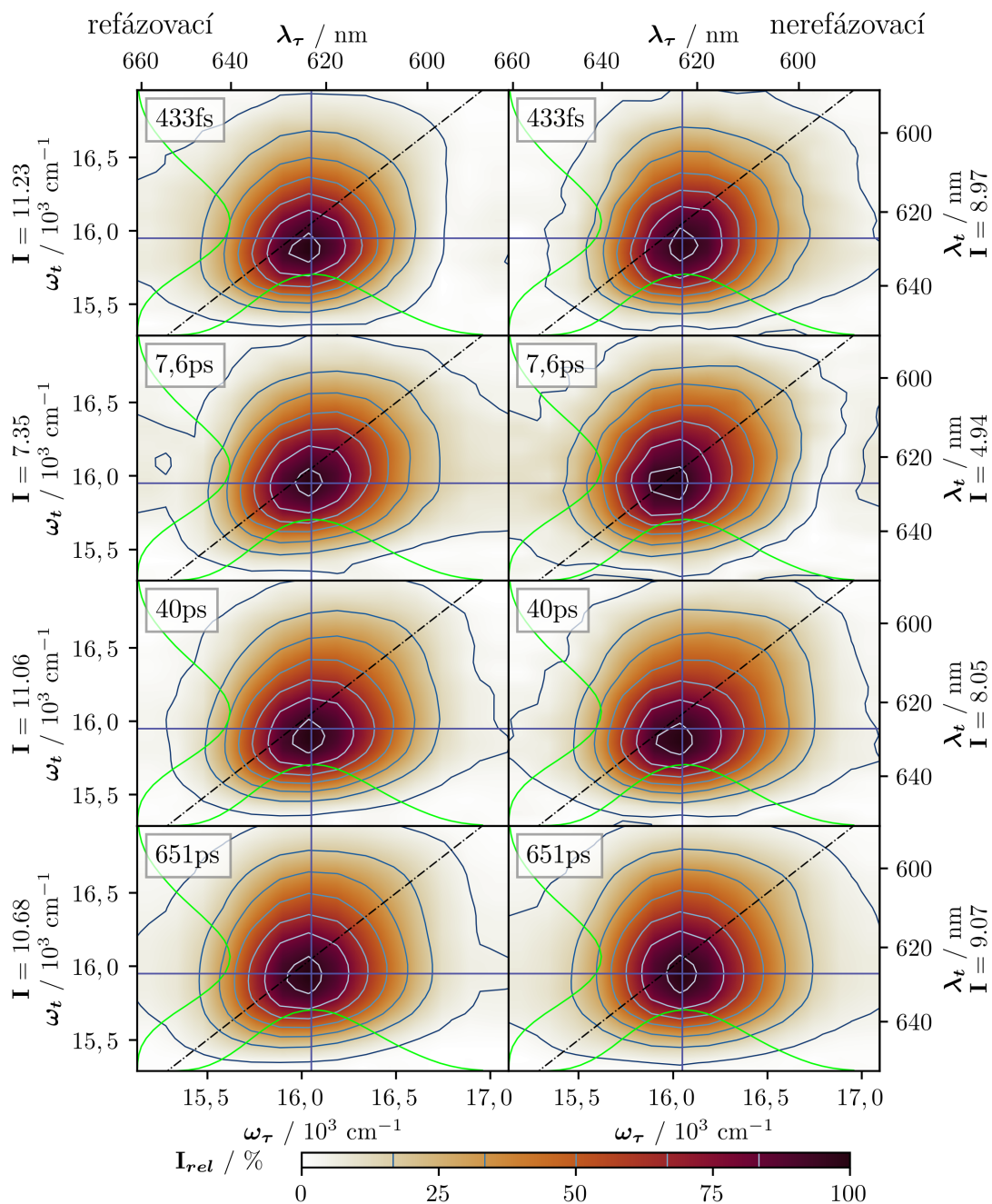
Tabulka 4.1: Přehled dob života  $\tau$  a frekvencí oscilací  $\omega$  komponent, které se vyskytovaly ve všech datových sadách pro měření ve spektrální oblasti kolem 620 nm.

neoscilující komponenty		oscilující komponenty			
$\tau$ [ps]	$\sigma_\tau$ [ps]	$\tau$ [fs]	$\sigma_\tau$ [fs]	$\omega$ [cm <sup>-1</sup> ]	$\sigma_\omega$ [cm <sup>-1</sup> ]
0,47	0,40	100	48	219	18
7,5	1,2	156	55	-247	26
36,6	7,8	350	171	-514	43
610	138				

Neoscilující komponenty se nacházely těsně pod diagonálou v okolí frekvence 16050 cm<sup>-1</sup> na excitační a 15950 cm<sup>-1</sup> na detekční ose. Získaná DAS byla prakticky shodná pro všechny měřené datové sady. Ukázková amplitudová spektra jsou vyobrazena na obrázku 4.3. Z grafu je dobře patrné, že všechny stopy jsou značně rozšířené, což stěžuje identifikaci centra peaku, jež je tvoří (je také možné, že jsou tvořeny celou řadou menších, ostřeji vymezených peaků, které však nejsme schopni rozeznat a vidíme pouze jejich kombinaci). Dále je vidět, že jsou stopy výrazně protažené ve smyslu rostoucí frekvence  $\omega_t$ . Z porovnání intenzit refázovací a nerefázovací složky vyplývá vyšší intenzita refázovací složky (přibližně 1,3 násobek nerefázovací).

V případě oscilujících komponent je situace značně složitější. Všechny datové sady vykazují komponenty zanesené v tabulce 4.1, kromě toho však jedna dvojice měření obsahuje komponenty s oscilací na 600 cm<sup>-1</sup> a -600 cm<sup>-1</sup>. V druhé dvojici měření jsou tyto komponenty s největší pravděpodobností také a lze je prostřednictvím globální analýzy izolovat, avšak vzhledem k velmi krátké době života, kterou jim analýza přisoudila nejsou jejich CAS důvěryhodná. Zároveň je z přehledové tabulky 4.1 jasně patrné, že frekvence oscilací komponent je možné určit poměrně přesně (relativní chyby cca 10%), zatímco doby života vykazují



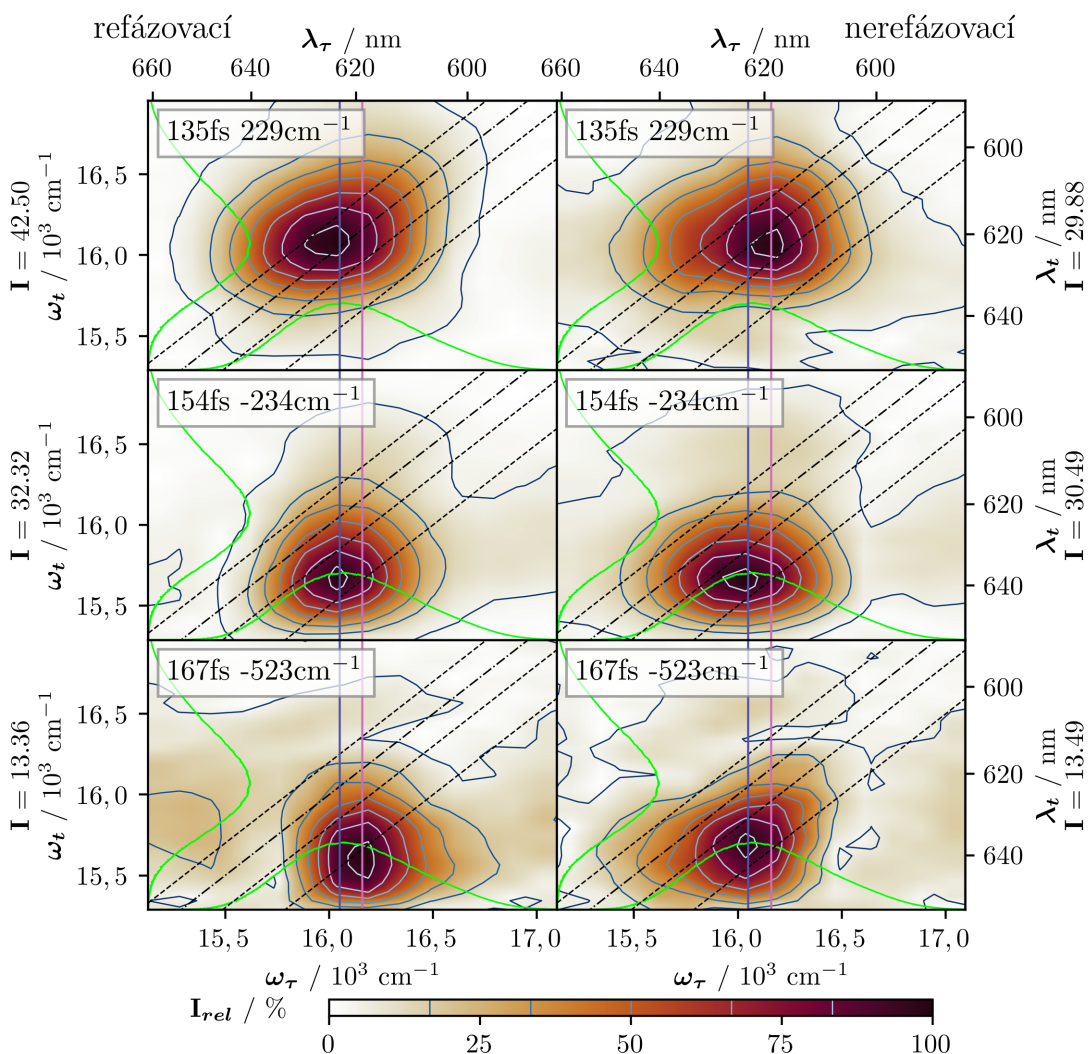


Obrázek 4.3: Ukázka amplitudových DAS neoscilujících složek dat změřených na spektrálním rozsahu kolem 620 nm za pokojové teploty. Všechny signály se nacházejí zhruba na 16050  $\text{cm}^{-1}$  na excitační a 15950  $\text{cm}^{-1}$  na detekční ose (je zde zobrazen tmavě modrý kříž pro lepší orientaci). Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

chyby v řádu desítek procent. Tento trend, tedy že nelze dobře určit doby života oscilujících komponent, ale pouze frekvenci jejich oscilace je patrný na všech datech měřených za pokojové teploty.

Na obrázku 4.4 jsou vyneseny CAS pro 3 základní komponenty, které se objevují ve všech datových sadách. Jedná se o CAS získaná z první dvojice měření,

druhá dvojice měření vykazovala CAS posunuté vždy o cca  $200 \text{ cm}^{-1}$  do vyšších excitačních frekvencí, avšak jinak si tvary peaků odpovídají - toto podivné chování nebylo bohužel uspokojivě vysvětleno (je však nutné zde brát v úvahu, že tento posun se pohybuje jen těsně nad hranicí rozlišení). Komponenty oscilující na zhruba  $\pm 220 \text{ cm}^{-1}$  leží nad, respektive pod úrovní neoscilujících signálů vždy s odstupem na detekční ose dosti podobným oscilační frekvenci. V případě oscilující komponenty na cca  $-500 \text{ cm}^{-1}$  je situace podobná, ovšem oproti předchozím komponentám je zde „prohozena“ role refázovací a nerefázovací složky v tom smyslu, že refázovací složka je oproti nerefázovací posunuta více do vyšších frekvencí  $\omega_\tau$ , což je v kontextu ostatních dat neobvyklé. Je ovšem také nutné poznamenat, že posledně jmenovaný efekt se pohybuje na hranici rozlišení a není jisté, zda je skutečný, nebo jde pouze o vliv šumu.



Obrázek 4.4: Ukázka amplitudových CAS oscilujících komponent ve spektrální oblasti kolem 620 nm za pokojové teploty. Svislé čáry jsou pomocné - modrá je umístěna stejně jako v případě předchozího grafu na  $16050 \text{ cm}^{-1}$  a růžová na  $16160 \text{ cm}^{-1}$ . Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

### 4.1.2 Spektrální oblast 630 nm

K experimentům s laserovým spektrem se středem v 630 nm bylo přikročeno až po změření dat na 620 a 670 nm, protože se ukázalo, že získaná DAS a CAS spektra se dostatečně nepřekrývají a chyběla by tak informace o spojitosti dat z obou spektrálních oblastí. Byly provedeny celkem tři experimenty, každý o dvou datových sadách, celkem tedy bylo získáno 6 datových sad. Ve všech sadách se v zásadě vyskytují 4 neoscilující komponenty, přičemž v jedné dvojici datových sad je komponenta s nejdelší dobou života očividně rozdělena do dvou a vystupuje zde tak 5 neoscilujících komponent. Oscilující komponenty se ve všech datových sadách vyskytují 3 (s výjimkou jednoho datasetu, kde není přesně oscilace  $-500 \text{ cm}^{-1}$ , ale jí velmi podobná komponenta). Doby života a frekvence těchto společných komponent jsou shrnuty v tabulce 4.2.

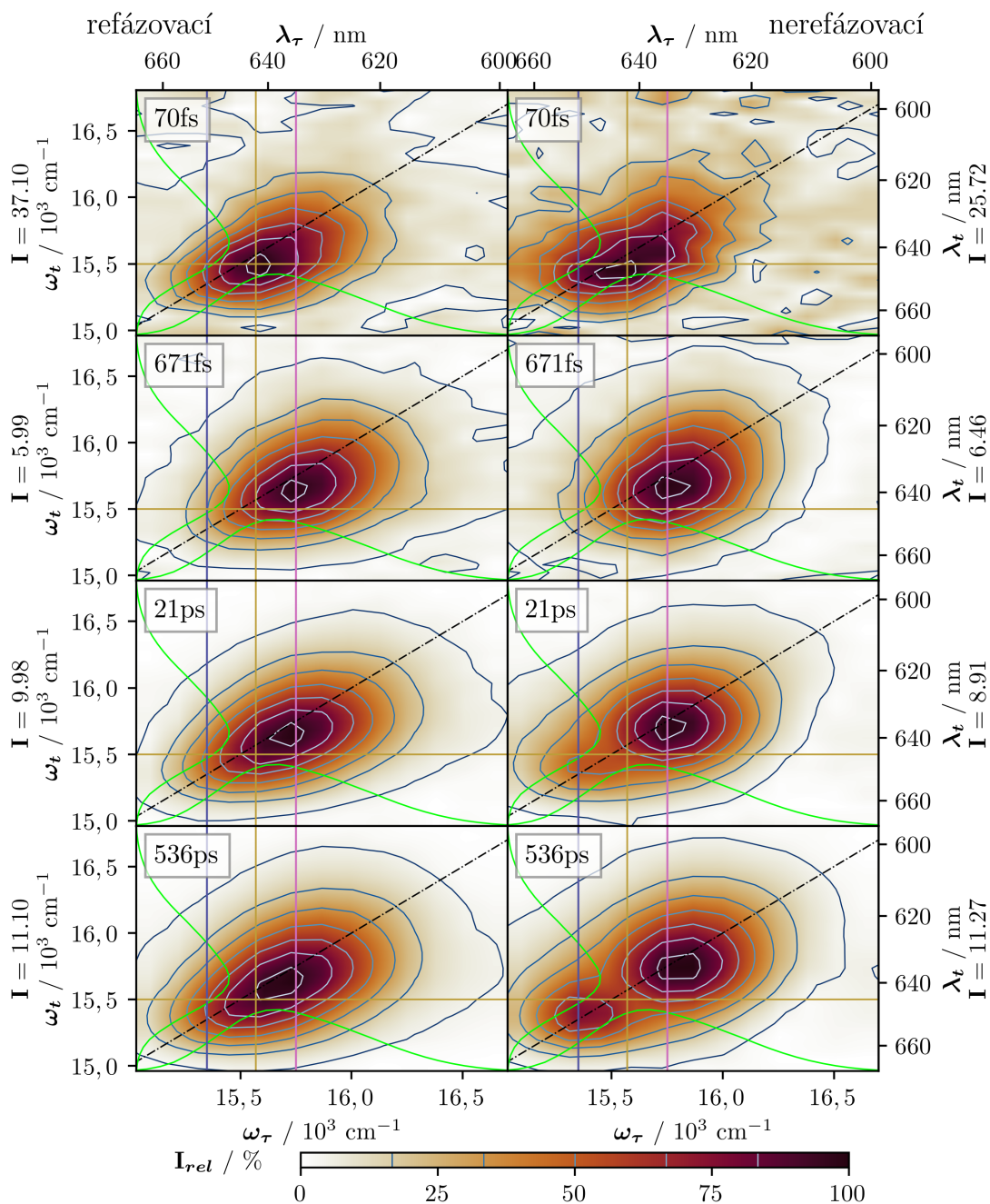
Tabulka 4.2: Přehled dob průměrných dob života a frekvencí společně s jejich směrodatnými odchylkami pro komponenty, jež se vyskytovaly prakticky ve všech datasetech měřených na spektrální rozsahu s centrem na 630 nm.

neoscilující komponenty		oscilující komponenty			
$\tau$ [ps]	$\sigma_\tau$ [ps]	$\tau$ [fs]	$\sigma_\tau$ [fs]	$\omega$ [ $\text{cm}^{-1}$ ]	$\sigma_\omega$
0,075	0,019	193	106	229	20
0,587	0,063	172	54	-216	22
17,5	4,6	186	93	-510,1	4,6
510	60				

Data ve spektrálním rozsahu okolo 630 nm vykazují poměrně zajímavou podobu neoscilujících komponent - viz obrázek 4.5. Všechny signály jsou velice výrazně protažené v diagonálním směru a leží na diagonále, či těsně pod ní. Pro krátký populační čas lze vidět střed peaku na excitační ose zhruba na  $15570 \text{ cm}^{-1}$  a na detekční na přibližně  $15500 \text{ cm}^{-1}$ . S prodlužující se dobou života lze u komponent sledovat protahování v diagonálním směru, jež naznačuje, že tyto komponenty zachycují ne jeden, ale minimálně dva stavy rozmístěné po diagonále. V neréfazovacích spekter je dokonce jasně vidět oddělení spodního stavu od horního a pozorujeme tak dva stav jeden stav v detekční ose na  $15350 \text{ cm}^{-1}$  a druhý přibližně na  $15750 \text{ cm}^{-1}$ .

Oscilující komponenty společné pro většinu datových sad na 630 nm jsou zachyceny na obrázku 4.6. Komponenta oscilující na cca  $-500 \text{ cm}^{-1}$  je umístěna výrazně pod diagonálou a je poměrně posunuta ve směru excitační osy do vyšších frekvencí. Je však třeba brát na zřetel, že stopa je již na kraji měřeného spektra a může být tedy utlumena a tento efekt může poměrně významně ovlivnit i její tvar.

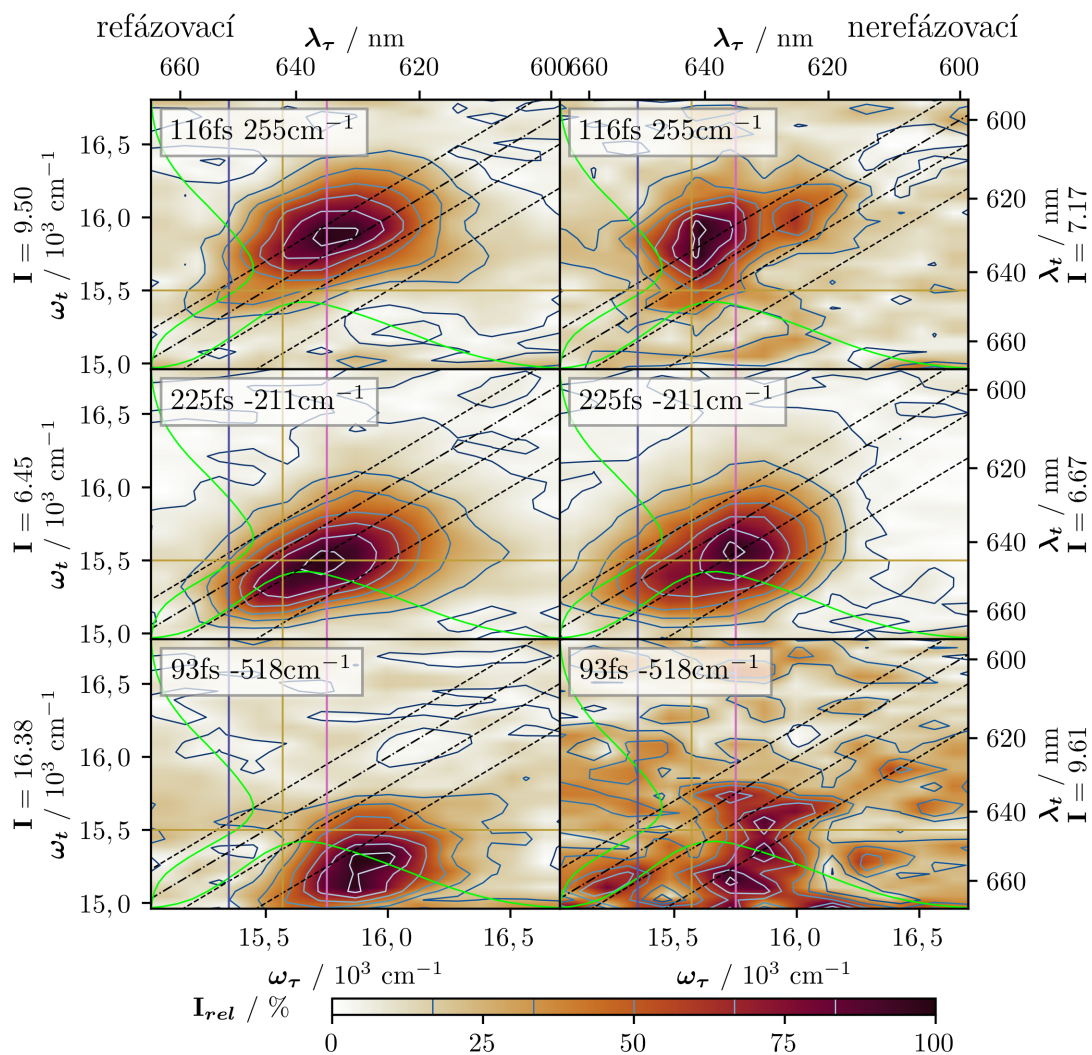
Peaky oscilací na kladné i záporné frekvenci kolem  $200 \text{ cm}^{-1}$  leží na excitační ose zhruba na  $15750 \text{ cm}^{-1}$ , což odpovídá poloze některých neoscilujících signálů a vůči nim jsou také posunuty o cca  $220 \text{ cm}^{-1}$  na detekční ose ve směru shodném se znaménkem oscilace komponenty (podobně jako u dat ze spekter ze spektrální oblasti 620 nm). Obě tyto oscilující komponenty jsou zároveň značně protáhlé ve



Obrázek 4.5: Ukázka amplitudových DAS neoscilujících komponent ve spektrální oblasti kolem 630 nm za pokojové teploty. V grafech jsou pomocné svislé čáry na 15350, 15570 a 15750  $\text{cm}^{-1}$  a vodorovná na 15500  $\text{cm}^{-1}$ . Pro dvě dlouhožijící komponenty je v grafech nerefázovací části dobře vidět, že je spektrum tvořeno dvěma peaky. Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

smyslu diagonály a dá se tušit, že nejsou tvořeny jen jedním stavem. Že se jedná o více stavů potvrzuje nerefázovací spektrum složky oscilující na cca 220  $\text{cm}^{-1}$ . U zhruba poloviny datových sad odhalila globální analýza dvojici oscilujících komponent, jejichž frekvence oscilací je právě zhruba 220  $\text{cm}^{-1}$ , navzájem se liší ve frekvenci pouze drobně a jejich CAS spektra mají podobný tvar co do celkové šířky, avšak hlavní peak je posunut (příklad takovéto dvojice viz obrázek



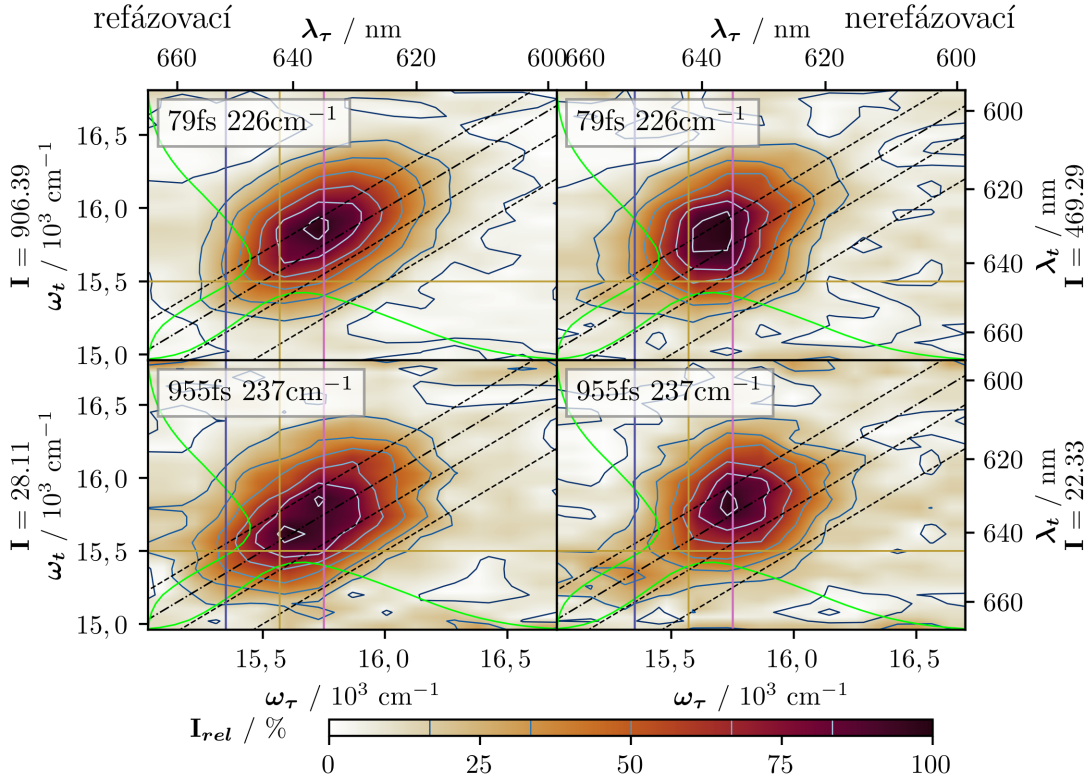


Obrázek 4.6: Ukázka amplitudových CAS oscilujících komponent, které se vyskytují ve většině datasetů měřených ve spektrální oblasti kolem 630 nm za pokojové teploty. Pomocné čáry v grafech jsou shodné s těmi na grafu neoscilujících komponent (viz obrázek 4.5), aby bylo možné porovnání. Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

4.7). Odtud lze usuzovat, že data obsahující dvě oscilující složky s velmi blízkou frekvencí oscilace, které jsou v některých datových sadách oddělitelné a v jiných se projevují značným rozšířením jediné nalezené komponenty s oscilací zhruba na  $220 \text{ cm}^{-1}$ . Obdobná situace pak panuje i v případě komponent s oscilací kolem  $-220 \text{ cm}^{-1}$ .

### 4.1.3 Spektrální oblast 670 nm

Měření ve spektrální oblasti okolo 670 nm vyžadovala využití jiné nopy než-li v případě měření na 620 a 630 nm, což je důvod, proč jsou spektra laseru, křivky LO13 a LO16 na obrázku 4.2, výrazně odlišná od zbylých spekter LO pro data za pokojové teploty. Byly provedeny opět dva experimenty, avšak kvůli technickým komplikacím byla jedna datová sada znehodnocena a celkem tak byly získány tři datové sady. Počet neoscilujících komponent se mezi datovými sadami různí



Obrázek 4.7: Příklad CAS dvojice komponent oscilujících s velmi blízkými frekvencemi v oblasti kolem  $220 \text{ cm}^{-1}$ . Obě komponenty byly globální analýzou získány z jedné datové sady (měřené na spektrálním rozsahu okolo  $630 \text{ nm}$  za pokojové teploty). Co do tvaru stopy jsou si obě komponenty velmi podobné, liší se pouze v poloze hlavního peaku. Pomocné čáry v grafu jsou shodné jako na 4.6. Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

od 4 do 6, v tabulce 4.3 jsou zaneseny doby života čtyř, které se vyskytovaly ve všech datových sadách (zbylé komponenty měly doby života v rozmezí stovek fs až jednotek ps). Oscilující komponenty se vyskytovaly v každé datové sadě přesně 3, jejich parametry viz tabulka 4.3.

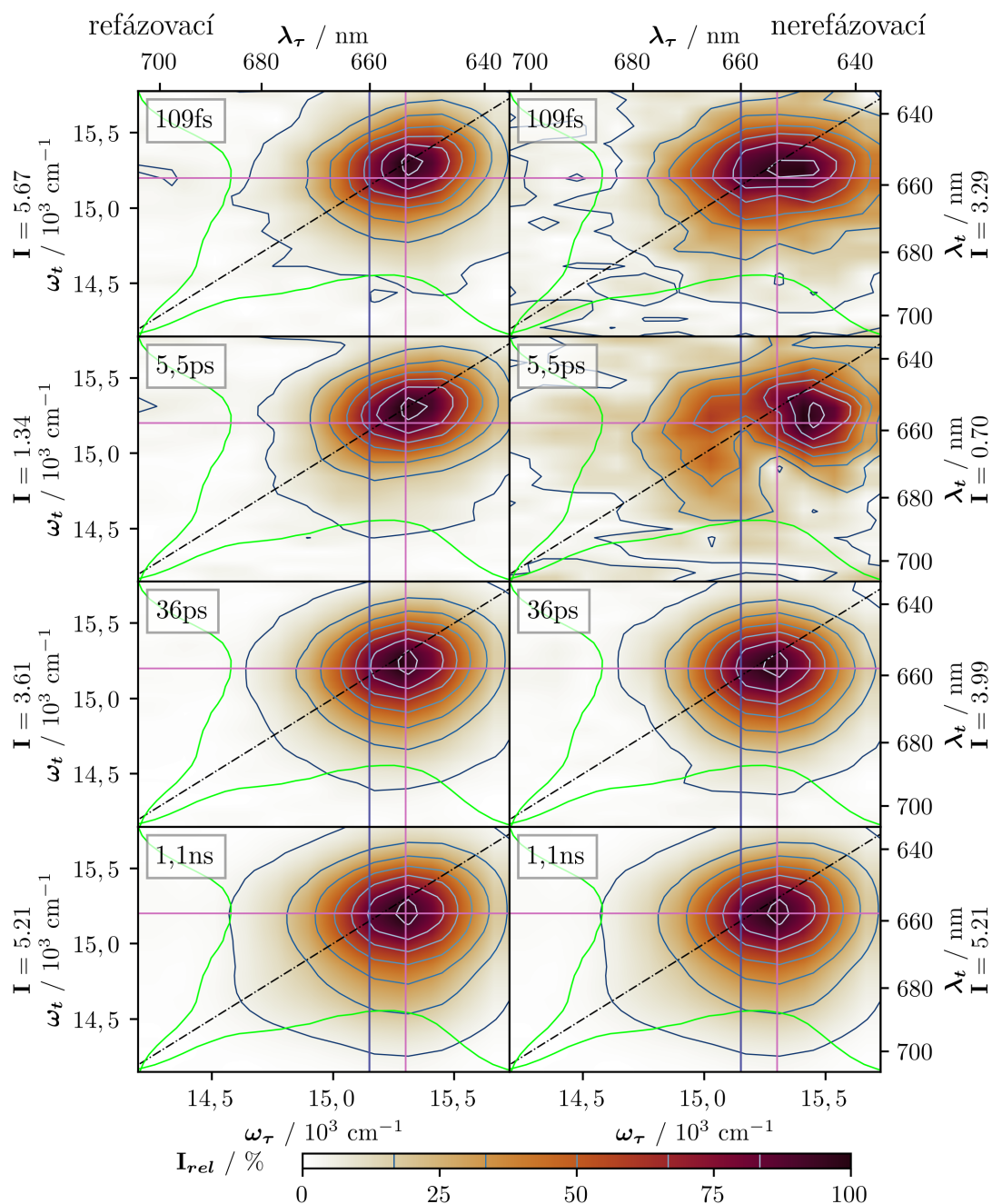
DAS neoscilujících komponent pro oblast  $670 \text{ nm}$  jsou zobrazena na obrázku 4.8. Komponenty s delšími dobami života mají výrazně protáhlý tvar do nižších frekvencí na detekční ose, což naznačuje přítomnost dalších peaků v tomto směru, avšak nelze to říci s jistotou. Ze spektra samotného to vypadá, že na diagonále ani v jejím okolí nejsou v oblasti nižších frekvencí žádné signály, což odpovídá tomu, že v tomto místě již absorpční křivka fykobilizomů klesá do velmi nízkých hodnot (viz srovnání s 4.2). Ovšem tvar stopy dlouhožijících komponent (výrazné protažení ve vertikálním i horizontálním směru) dává jasně tušit, že se v oblasti pod  $14800 \text{ cm}^{-1}$  nějaký stav přeci jen nachází - je tedy jasné, že tento stav samotný mám malou oscilátorovou sílu a proto není v datech viditelný.

Všechny datové sady z oblasti kolem  $670 \text{ nm}$  obsahují přesně tři oscilující komponenty (viz obrázek 4.9), což je rozdíl oproti ostatním spektrálním oblastem, kde různé datové sady typicky obsahovaly nějaké specifické oscilace. Za povšimnutí

Tabulka 4.3: Přehled dob průměrných dob života a frekvencí společně s jejich směrodatnými odchylkami pro komponenty vyskytující se všech datových sadách měřených na spektrální rozsahu okolo 670 nm.

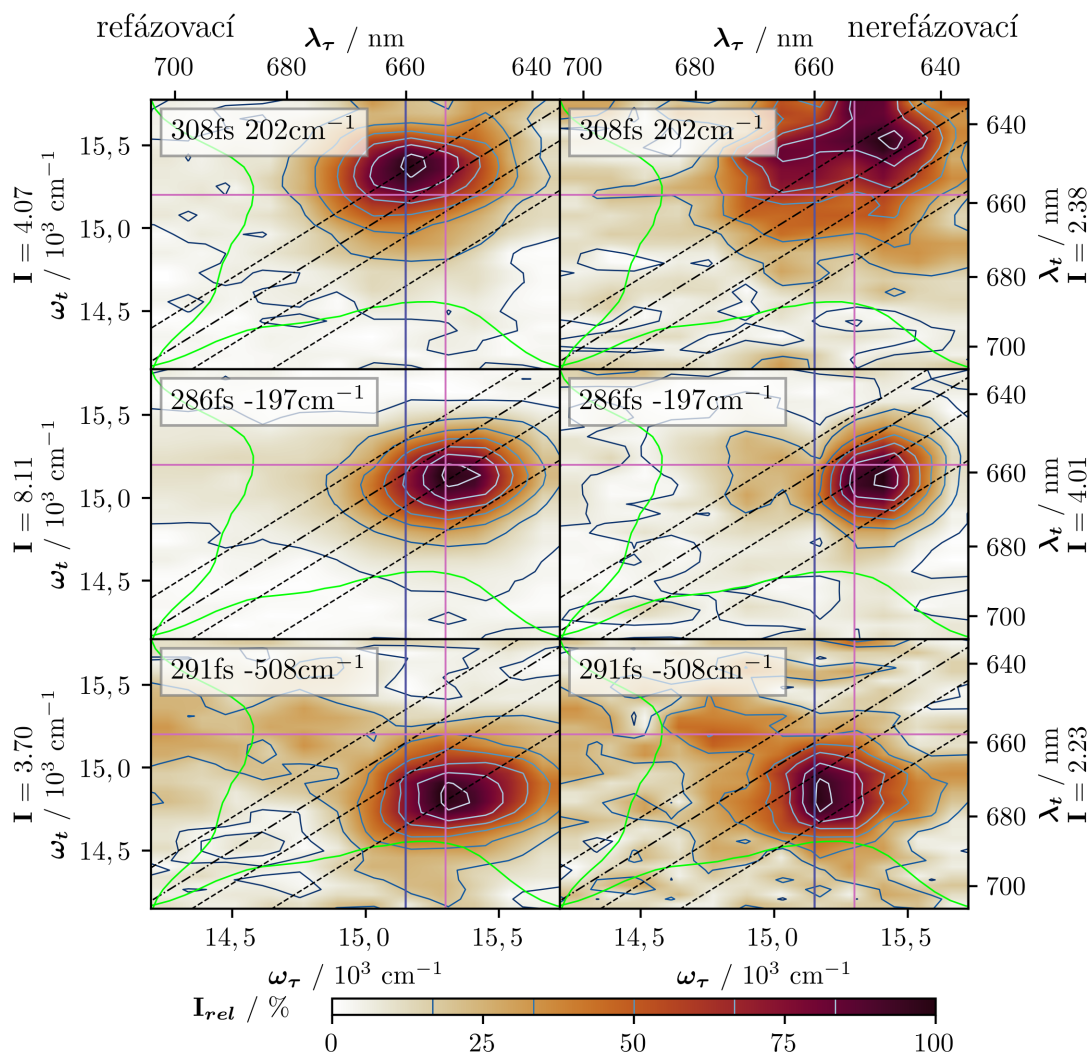
neoscilující komponenty		oscilující komponenty			
$\tau$ [ps]	$\sigma_\tau$ [ps]	$\tau$ [fs]	$\sigma_\tau$ [fs]	$\omega$ [cm <sup>-1</sup> ]	$\sigma_\omega$
0,09	0,16	274	35	202	3
5,8	2,5	254	41	-198	2
50	16	259	37	-509	3
$1,68 \cdot 10^3$	$0,55 \cdot 10^3$				

také stojí, že doby života oscilujících složek vykazují relativní chyby jen zhruba 15%, takže oproti měřením v ostatních spektrálních oblastech, jsou zde doby života určeny dosti přesně. Stejná situace je i u určení frekvence oscilací, kdy je relativní chyba jen zhruba 2%. Komponenta oscilující na přibližně 200 cm<sup>-1</sup> je posunuta ve směru detekční osy zhruba o 200 cm<sup>-1</sup> výše a signál oscilující na -200 cm<sup>-1</sup> zase níže. V případě oscilace na -500 cm<sup>-1</sup> je posunutí o cca -400 cm<sup>-1</sup>, což je s přihlédnutím k rozlišení dat hodnota ne-zcela vzdálená od frekvence oscilace. Zajímavá je také poloha stop v horizontálním směru, kdy signál oscilující na 200 cm<sup>-1</sup> je oproti zbylým dvěma výrazně posunutý do oblasti nižších frekvencí přibližně o 140 cm<sup>-1</sup>.



Obrázek 4.8: DAS vybraných neoscilujících komponent pro oblast kolem 670 nm, jež se vyskytují ve všech změřených datových sadách za pokojové teploty. Modrá pomocná čára je umístěna na  $15200 \text{ cm}^{-1}$  (je zde kvůli lepšímu porovnání s oscilujícími komponentami) a růžový pomocný kříž je umístěn na  $15300 \text{ cm}^{-1}$  v excitační a  $15200 \text{ cm}^{-1}$  v detekční ose. Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.





Obrázek 4.9: CAS oscilujících komponent zjištěných v datech měřených za pokojové teploty ve spektrální oblasti kolem 670 nm. Pomocné čáry jsou shodné jako na 4.8. Komponenty oscilující na přibližně  $\pm 200 \text{ cm}^{-1}$  jsou vždy posunuty v ose  $\omega_t$  do příslušného směru o právě přibližně  $200 \text{ cm}^{-1}$  oproti neoscilujícímu signálu. Složka oscilující na  $-500 \text{ cm}^{-1}$  je posunuta po detekční ose o cca  $-400 \text{ cm}^{-1}$ . Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

## 4.2 Nízkoteplotní data

Měření za teploty kapalného dusíku (77 K) přináší typicky lepší rozlišení díky déle „žijícím“ koherencím v signálu. To zároveň ale také znamená nutnost měřit větší rozsah koherenčních časů, což se projeví významným prodloužením času běhu experimentu. V rámci nízkoteplotních experimentů bylo proto provedeno výrazně méně měření. Pro každou spektrální oblast byla změřena pouze jedna datová sada<sup>4</sup>. Zároveň bylo přistoupeno k úpravě populačních časů, protože z experimentů za pokojové teploty bylo již jasné, že pro oscilující signály je zajímavá především oblast populačních časů do 1 ps. Proto byl zmenšen krok populačních časů pro oblast do 1 ps a zvětšen krok v oblasti nad 700 ps tak, aby byla zachována rozumná časová délka experimentu.

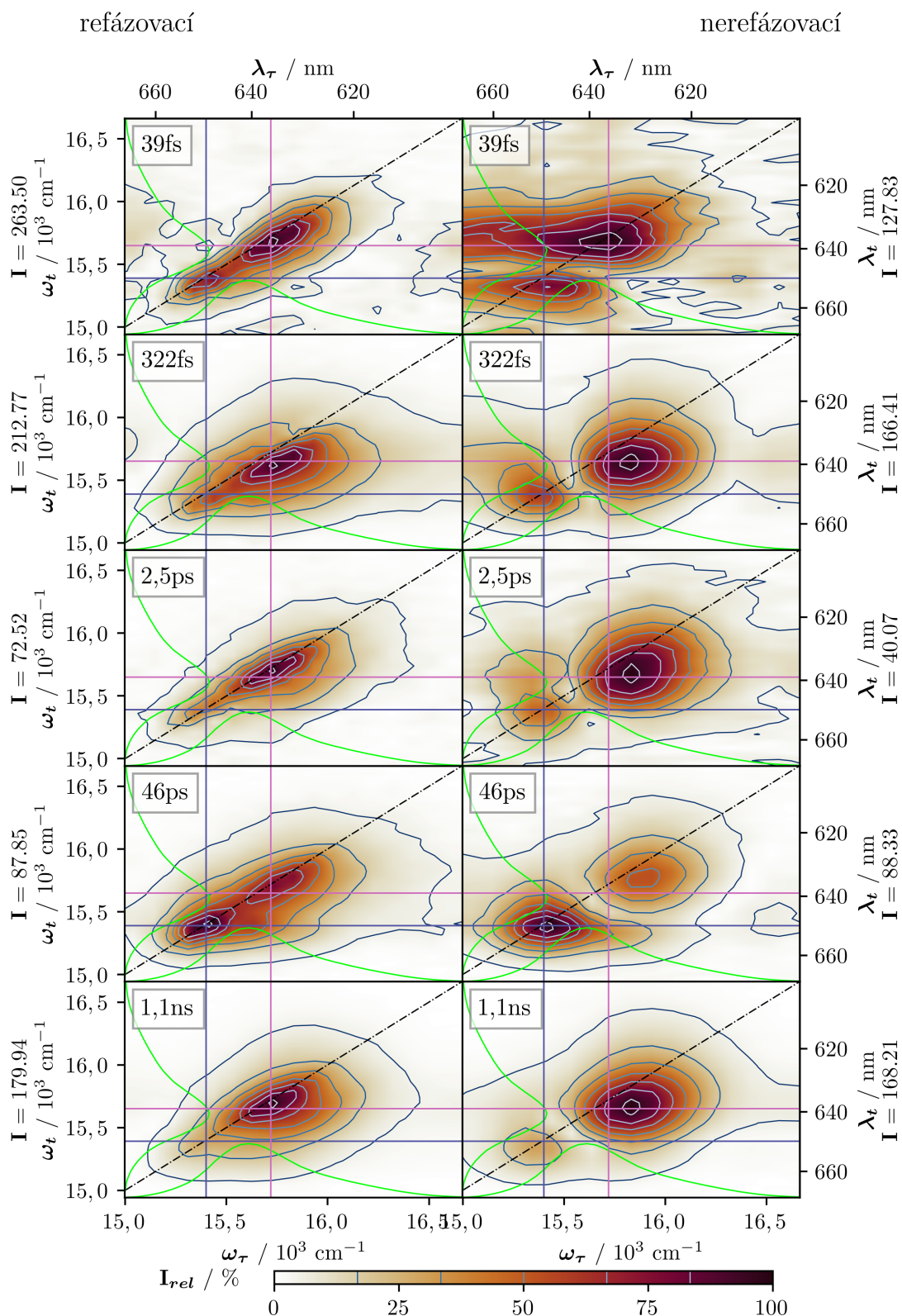
### 4.2.1 Spektrální oblast 630 nm

Data získaná za nízké teploty ze spektrální oblasti kolem 630 nm se zdála být poměrně čistá a jejich fitování za pomoci globální analýzy odhalilo celkem 5 neoscilujících a 5 oscilujících složek. DAS neoscilujících složek jsou zobrazeny na obrázku 4.10, ze kterého je jasně zřetelné, že se téměř ve všech spektrech objevují dva peaky ležící těsně pod diagonálou na  $15400$  a  $15390\text{ cm}^{-1}$  a  $15720$  a  $15640\text{ cm}^{-1}$  (první je vždy uvedena souřadnice na excitační, poté na detekční ose). V nerefázovacích spektrech jsou jasně patrná oddělení těchto dvou peaků. Dále je patrné prodloužení stop ve směru osy  $\omega_t$  pod peakem na přibližně  $15700\text{ cm}^{-1}$ , které dává tušit výskytu dalších, méně intenzitních signálů.

Nalezené oscilující komponenty (viz obrázek 4.11) vykazují frekvence oscilací  $222$ ,  $280$ ,  $-207$ ,  $-279$  a  $-511\text{ cm}^{-1}$ . Nacházejí se tedy mezi nimi komponenty se stejnou frekvencí jako u dat za pokojové teploty (frekvence cca  $\pm 220\text{ cm}^{-1}$  a  $-511\text{ cm}^{-1}$ ), ale také další dvě komponenty, které u dat za pokojové teploty nemají obdobu (nebo alespoň ne takovou, která by se opakovala napříč různými dataseťmi). Podoba CAS pro komponenty s oscilací  $222$  a  $280\text{ cm}^{-1}$  jsou značně odlišné, stejně tak pro dvojici  $-207$  a  $-279\text{ cm}^{-1}$ .

---

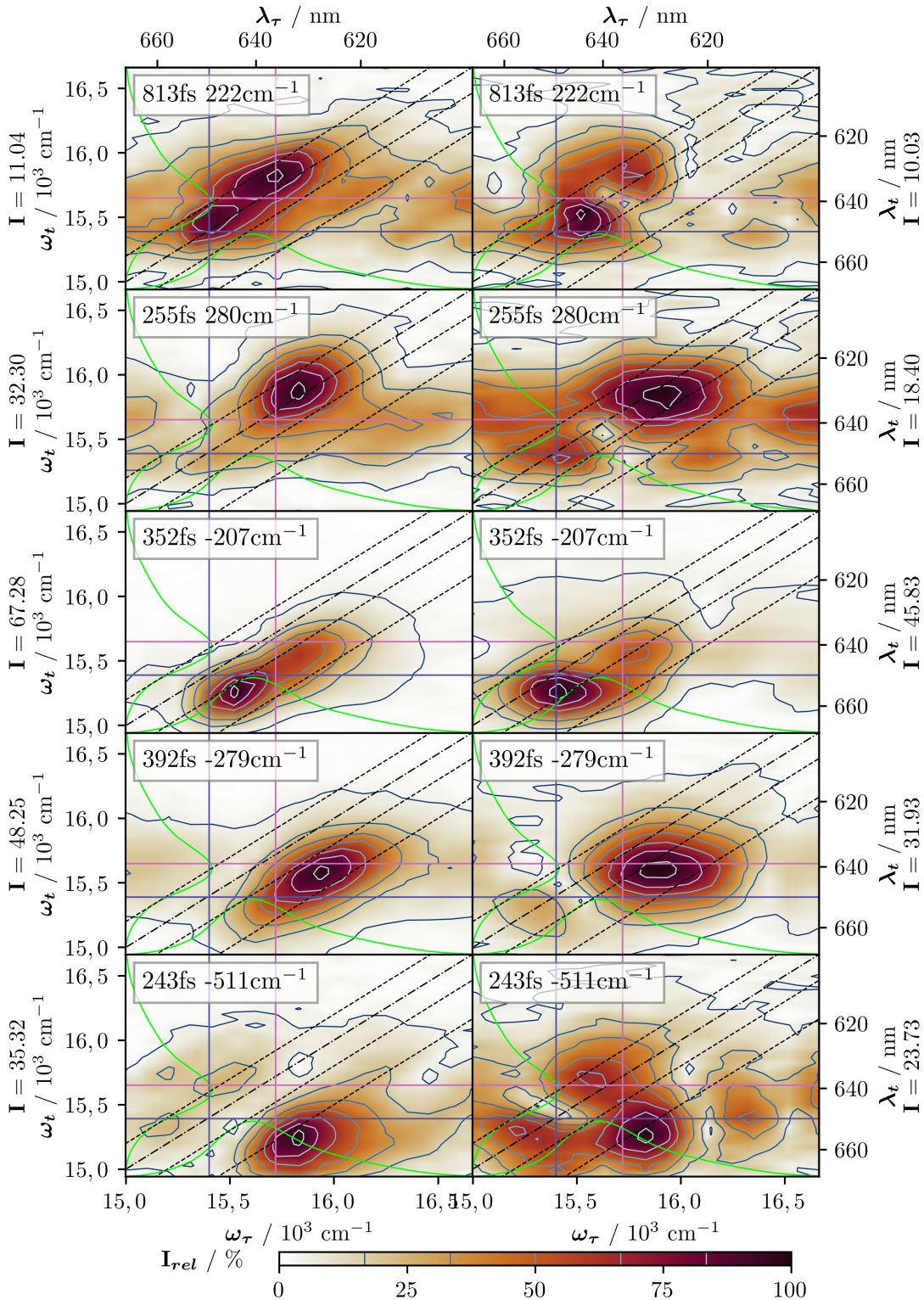
<sup>4</sup>V oblasti 630 nm byla ve skutečnosti provedena dvě měření. První měření muselo být vyřazeno z důvodu poškození vzorku. Absorpční spektrum vzorku po měření vykazovalo velkou odlišnost od spektra před měřením. Příčinu poškození vzorku se sice nepovedlo odhalit, ale jako pravděpodobné se zdá natátí vzorku v průběhu měření vlivem špatného nastavení kryostatů. Následně bylo proto provedeno ještě opakované měření na novém vzorku.



Obrázek 4.10: DAS neoscilujících komponent nalezených v nízkoteplotních datech měřených na spektrálním rozsahu kolem 630 nm. Modrý pomocný kříž je na 15400  $\text{cm}^{-1}$  na excitační a na 15390  $\text{cm}^{-1}$  na detekční ose, růžový na 15720 a 15640  $\text{cm}^{-1}$ . Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

refázovací

nerefázovací



Obrázek 4.11: CAS oscilujících komponent, které byly odhaleny s pomocí globální analýzy v nízkoteplotných datech měřených na spektrálním rozsahu kolem 630 nm. Pomocné kříže jsou stejné jako na obrázku 4.10. Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.



## 4.2.2 Spektrální oblast 675 nm

Data získaná v této spektrální oblasti vykazovala bohužel poměrně velký šum, kvůli čemuž byla při globální analýze nakonec využívána jen data pro populační časy do 1 ps, protože oscilující signály velmi rychle slábly a kvůli matematickému pozadí globální analýzy nebylo možné při uvažování vyšších časů odhalit rychlé oscilující komponenty. Samozřejmě tento přístup s sebou nese zvýšení nepřesnosti určení doby života dlouhožijících neoscilujících signálů. V datech se podařilo nalézt pouze dvě neoscilující komponenty s dobou života 210 fs a 9,9 ps (viz obrázek 4.12) a jedinou oscilující komponentu<sup>5</sup> s dobou života také 9,9 ps a frekvencí oscilace  $487\text{ cm}^{-1}$  (viz obrázek 4.13). Skutečná hodnota doby života déle žijící komponenty není známa, protože číslo 9,9 ps je hranicí ve fitovacím algoritmu při omezení fitovaných dat a skutečná hodnota tak může být mnohem vyšší.

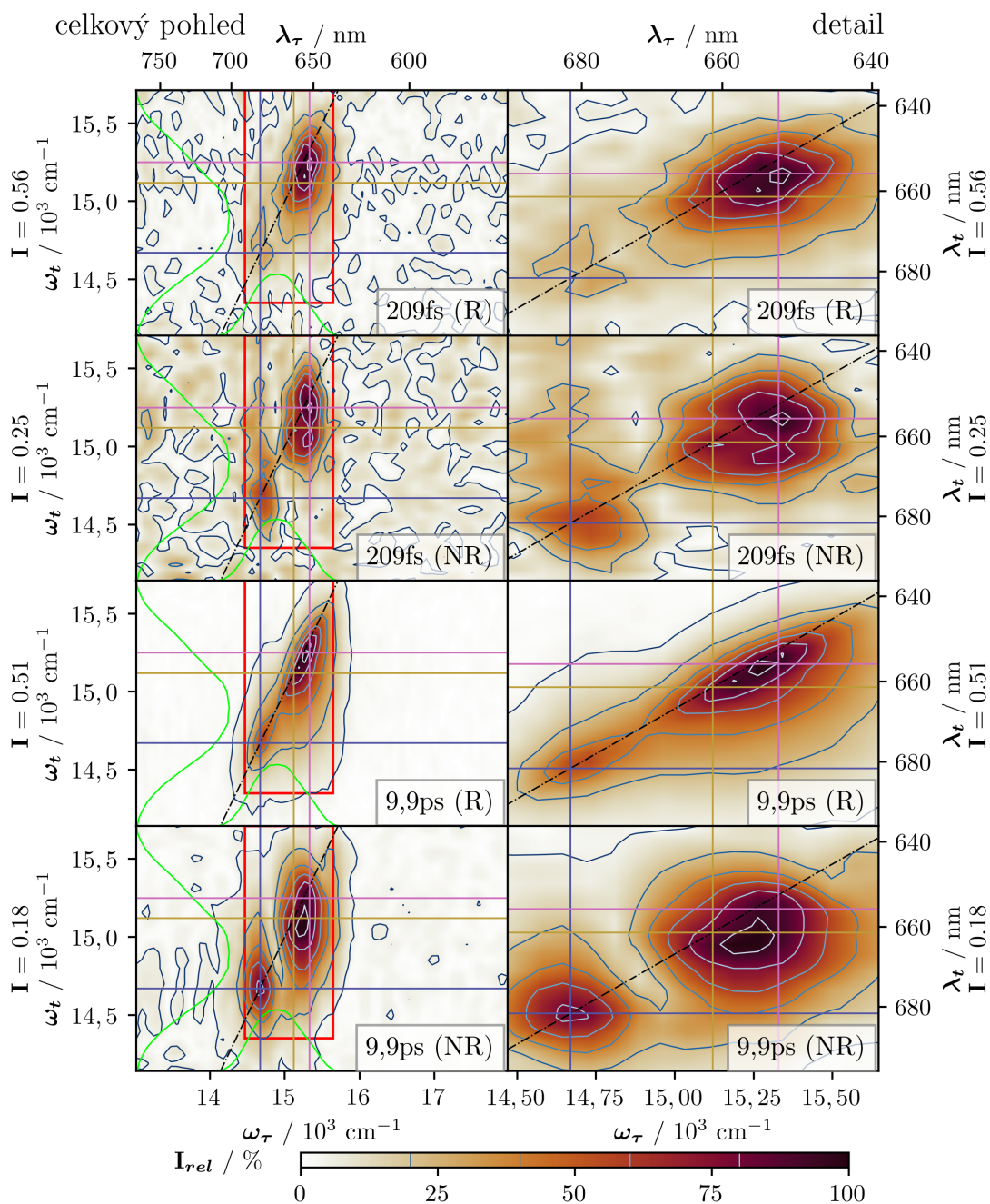
Ze spekter neoscilujících komponent (obrázek 4.12) je dobře patrné, že signál je tvořen ze dvou částí ležících na diagonále - menší část se středem na  $14670\text{ cm}^{-1}$  a výše položená větší část v okolí  $15270\text{ cm}^{-1}$ . Obě stopy jsou značně protáhlé ve smyslu detekční osy, což dává tušit, že jsou složené z několika komponent. Niž položená menší stopa je protažena do vyšších frekvencí ve smyslu detekční osy. Větší stopa, jež leží v okolí  $15270\text{ cm}^{-1}$ , vykazuje v případě komponenty s dobou života 209 fs poměrně jasnou strukturu. Hlavní peak je položen těsně pod diagonálou na  $15330\text{ cm}^{-1}$  v excitační ose a lze pod ním tušit další, ve smyslu detekční osy, níže položený stav. Druhý silný peak je níže na diagonále na  $15120\text{ cm}^{-1}$ . Komponenta s dobou života 9,9 ps má jednotlivé peaky více „slité“ dohromady, avšak i zde je jasně patrné protažení stopy do nižších detekčních frekvencí, respektive její „trojúhelníkovitý“ tvar, který dává tušit přítomnosti přenosu excitační energie.

Globální analýzou se podařilo odhalit pouze jedinou oscilující složku, jež je zobrazena na obrázku 4.13. Získané CAS je negativně ovlivněno nízkou intenzitou sledované komponenty, avšak i tak lze rozeznat, že střed stopy v excitační ose je zhruba na  $14870\text{ cm}^{-1}$ . V detekční ose je stopa silně protáhlá a nelze určit její střed, jelikož pro vysoké frekvence je signál tlumen lokálním oscilátorem, který zde už značně slábne. Jisté je jen to, že střed stopy je silně nad diagonálou, alespoň o  $300\text{ cm}^{-1}$ .

V datech se však vyskytovaly i další oscilující signály, které sice nebylo možné nafitovat v průběhu globální analýzy, ale není pochyb, že se v datech skutečně nacházejí. Celkem byly takto objeveny tři oscilující komponenty a sice  $-222$ ,  $-482$  a  $445\text{ cm}^{-1}$ . Protože se nepodařilo tyto signály nafitovat, není známá jejich doba života, ale známe podobu jejich oscilačních map<sup>6</sup> - viz obrázek 4.14. Komponenta oscilující na  $-222\text{ cm}^{-1}$  se nachází z hlediska excitační osy na stejném místě jako silný neoscilující peak a z hlediska detekční osy je posunuta o přibližně  $-200\text{ cm}^{-1}$ .

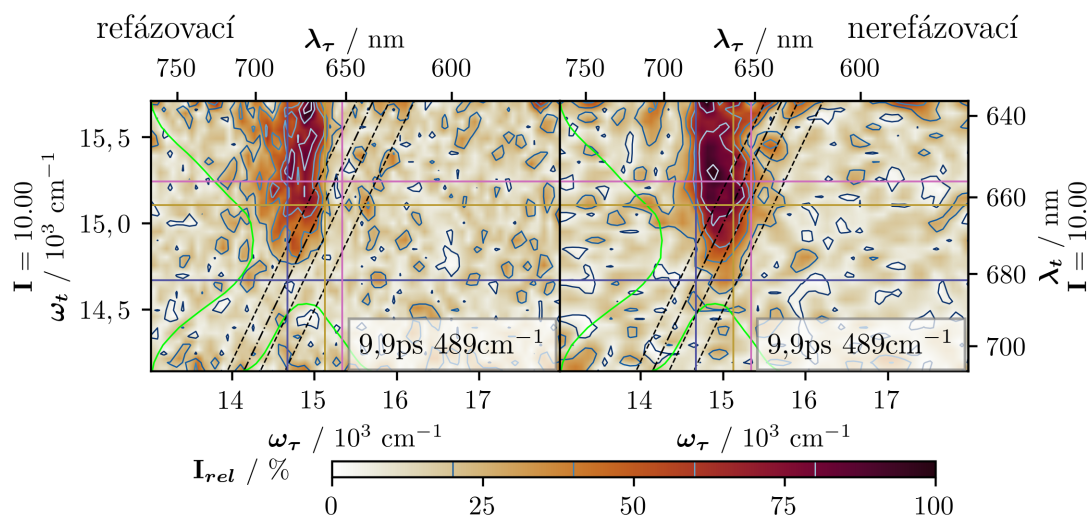
<sup>5</sup>Přítomnost pouze jediné oscilující komponenty je nezvyklá. Vysvětlovat by tento fakt mohla skutečnost, že spektrum LO má oblasti 650 nm a níže již malou intenzitu a je tak možné, že pokud je původ dalších oscilujících signálů v této spektrální oblasti, není je již vidět.

<sup>6</sup>Protože jde o oscilační mapy, není možné jakkoliv porovnávat jejich absolutní intenzity s intenzitami u DAS a CAS spekter.

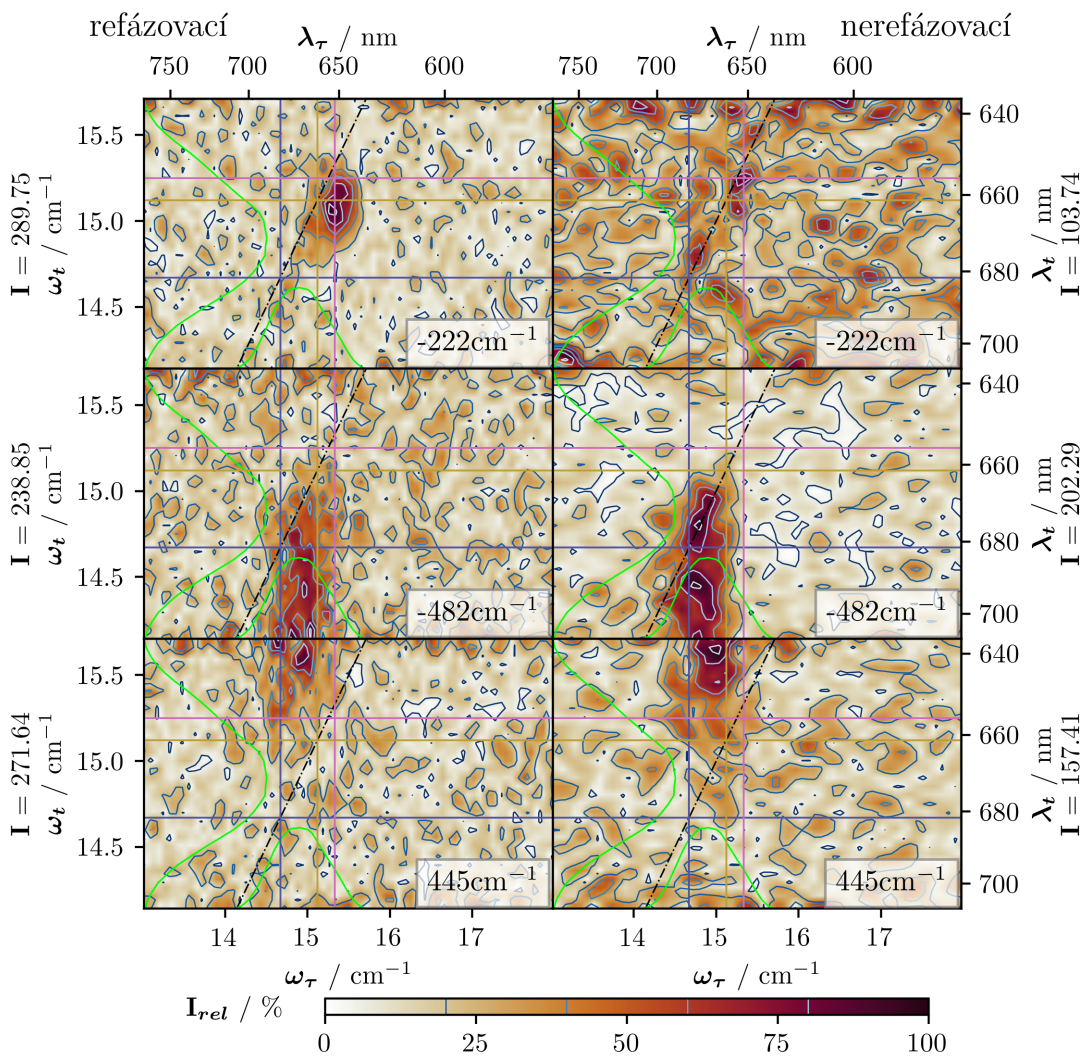


Obrázek 4.12: DAS neoscilujících komponent pro nízkoteplotní data měřená se spektrálním rozsahem kolem 675 nm. V levém sloupci jsou získaná spektra, v pravém pak výřezy zajímavých oblastí (výřez vyznačen v původním spektru červeně). Refázovací spektra jsou označena *R* a nerefázovací *NR*. Pomocné kříže jsou na diagonále na  $14670 \text{ cm}^{-1}$  (modrý) a  $15120 \text{ cm}^{-1}$  (žlutý) a růžový na  $15330 \text{ cm}^{-1}$  v  $\omega_\tau$  a  $15250 \text{ cm}^{-1}$  v  $\omega_t$ . Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.

Zbylé dvě komponenty se na excitační ose nacházejí na stejném místě, jako na-fitované oscilující komponenty (viz obrázek 4.13), přičemž oscilace na  $-482 \text{ cm}^{-1}$  je pod diagonálou, avšak nelze určit její polohu blíže a oscilace na  $445 \text{ cm}^{-1}$  je v detekční ose položena tak vysoko, že se nachází prakticky na hraně lokálního oscilátoru, kvůli čemuž je určení její polohy nejisté.



Obrázek 4.13: CAS oscilující komponenty objevené v nízkoteplotních datech měřených na spektrálním rozsahu kolem 675 nm. Pomocné kříže jsou stejné jako na 4.12. Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.



Obrázek 4.14: Oscilační mapy signálů z nízkoteplotních dat ze spektrální oblasti 675 nm, které se nepodařilo nafitovat v rámci globální analýzy, avšak jistě se v datech nacházejí. V grafech jsou vepsány pouze frekvence oscilací, protože doby života se nepodařilo určit. Pomocné kříže, jež jsou shodné s obrázkem 4.12. Detailní popis všech aspektů grafů viz sekce Popis dále užívaných grafů.



## 4.3 Shrnutí získaných dat

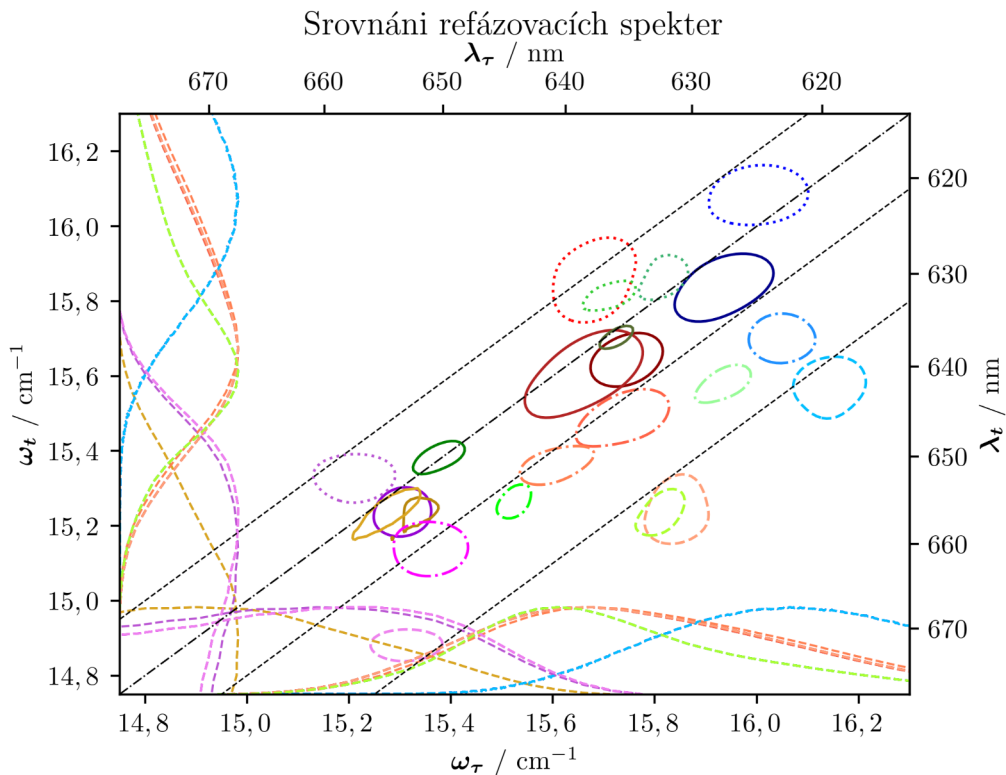
Data jsou graficky shrnuta na obrázku 4.15, kde jsou vyneseny všechny typické signály, jež byly popsány výše. Z grafu je jasně viditelné, že neoscilující signály, v měření za pokojové teploty, leží pod diagonálou (zhruba o  $50 - 100 \text{ cm}^{-1}$ ), stejně tak většina oscilujících signálů leží pod diagonálami posunutými o frekvence oscilací ( $200, -200$  a  $-500 \text{ cm}^{-1}$ ).

Data za pokojové teploty vykazují obvykle 4 neoscilující komponenty, jednu v řádek desítek fs, druhou ve stovkách fs, třetí v desítkách ps (nebo delší) a poté jednu velmi dlouhou v řádu stovek ps, kterou ovšem není nikdy možné přesně určit, protože měření probíhala pouze do 200 ps populačního času. V datových sadách ze spektrálních oblastí 630 a 670 nm se vyskytují peaky na přibližně  $15350 \text{ cm}^{-1}$ . V sadě dat měřené na 630 nm jsou dvě komponenty s peakem na této pozici, jež vykazují doby života 21 a více než 500 ps. V sadě z oblasti 670 nm se na této pozici nachází prakticky všechny neoscilující signály a s výjimkou jediného mají doby života vyšší než 5 ps. Zdá se tak, že stav ležící na  $15350 \text{ cm}^{-1}$  je pravděpodobně dlouhožijící. Ač se peaky nacházejí na stejných místech, nejsou co do tvaru stejné. Tento efekt může být způsoben deformací dat klesající intenzitou spektra laseru v těchto místech. U ostatních pozorovaných stavů není bohužel, kvůli překryvu jejich spektrálních signálů, možné jim jednoznačně přiřadit doby života.

Nízkoteplotní data v oblasti 630 nm vykazují podobný počet neoscilujících komponent jako data za pokojové teploty, přičemž jedna komponenta je rozdělena ve spektru na dva peaky. Komponenta ležící přibližně na  $15730 \text{ cm}^{-1}$  dohasíná na široké škále časů, zatímco komponenta na  $15400 \text{ cm}^{-1}$  má dobu života především 46 ps. Naproti tomu nízkoteplotní data v oblasti 670 nm mají poměrně špatnou kvalitu a globální analýza v nich našla pouze dvě neoscilující komponenty. Obě tyto komponenty se skládají ze dvou peaků, přičemž peak na zhruba  $14670 \text{ cm}^{-1}$  je výraznější v případě komponenty s dobou života 9,9 ps.

V datech získaných za pokojové teploty trpí určení dob života neoscilujících komponent poměrně velkými nejistotami. Naproti tomu u oscilujících komponent jsou doby života určeny často s menšími relativními chybami. Frekvence oscilací pak vykazují výrazně nejmenší relativní chyby. V případě nízkoteplotních dat se nejistoty určení dob života, či případně frekvencí oscilací bohužel nepodařilo zjistit, protože z časových důvodů nebyl naměřen dostatečný počet datových sad.

Ve všech spektrálních oblastech za pokojové teploty (a v nízkoteplotních datech kolem 630 nm) byly nalezeny oscilující komponenty s frekvencemi zhruba  $\pm 220$  a  $-511 \text{ cm}^{-1}$ . Jak je vidět z grafů zachycujících zmíněné komponenty, vypadá to, že se tyto signály hýbou společně se změnou spektra LO. Dále je dobře patrné, že jsou posunuty přibližně o hodnotu své frekvence oscilace vůči neoscilujícím signálům. Doby života všech těchto komponent se pohybují v nižších stovkách fs.



Obrázek 4.15: Přehledové srovnání všech měřených dat. V grafu jsou vyneseny kontury na úrovni 97% intenzity vynášeného signálu. Modré čáry patří datům ze spektrální oblasti 620 nm, červené datům z oblasti 630 nm, fialové a růžové 620 nm, zelené datům za nízké teploty na 630 nm a zlaté nízkoteplotním datům na 670 nm. Plnou čarou jsou vyneseny neoscilující komponenty, tečkovaně oscilace na  $200 \text{ cm}^{-1}$ , čerchovaně na  $-200 \text{ cm}^{-1}$  a čárkovaně na  $-500 \text{ cm}^{-1}$ . V grafu je vynesena diagonála (čerchovaně) a posunuté diagonály o právě zmíněné frekvence oscilací. Na spodní a levé straně grafu jsou vyneseny křivky lokálních oscilátorů.

## 5. Diskuze

Jak již bylo zmíněno dříve, vzorek intaktních fykobilizomů *T. elongatus* vykazuje velmi krátkou dobu života koherencí a sice necelých 100 fs. Tato rychlá dekoherence znamená, že signál vzorku v koherenčním čase  $\tau$  rychle klesá a brzy se ztrácí v šumu. Vzhledem k tomu, že měření získaná data jsou na krátkém časovém úseku, po provedení Fourierovy transformace na ose koherenčního času nutně dostáváme nízké frekvenční rozlišení na ose  $\omega_\tau$ . Nízké rozlišení prezentovaných dat má tedy primární původ ve vlastnostech vzorku samotného, čili tento majoritní důvod nelze nijak odstranit, či obejít a nevysoké rozlišení je v případě tohoto vzorku do značené míry nevyhnutelné. Pochopitelně by se dala kvalita dat zlepšit potlačením šumu<sup>1</sup>, či zvýšením excitační intenzity, což s sebou ovšem nese nemalé riziko poškození měřeného vzorku.

Dalším problémem v rámci zpracování dat byla nemožnost od sebe správně separovat refázovací a nerefázovací složku signálu. Tato nedostatečná separace se projevuje „prosáknutím“ signálů mezi refázovacími a nerefázovacími spektry, což samozřejmě může mít dramatický vliv na polohu peaků, zvláště v nerefázovacích datech, která mají typicky nižší intenzitu a jsou tak citlivější na kontaminaci refázovací složkou. Příčina nemožnosti správné separace obou složek je opět v krátké době života koherencí vzorku. Refázovací a nerefázovací signál je od sebe oddělován pomocí rozdělovací funkce, jež má podobný tvar jako Heavisidova, ovšem není pravoúhlá. Refázovací a nerefázovací signály se v určité oblasti koherenčních časů vždy překrývají vlivem konečné délky užívaného excitačního pulzu a není je možné zcela oddělit. Pokud je tato „přechodová“ oblast krátká vůči zbytku oblasti se signálem, lze tento efekt zanedbat. V případě krátkých dob života koherencí ovšem přechodová oblast mezi refázovacím a nerefázovacím signálem tvoří značnou část z celkové oblasti se signálem, tudíž nemalou část z refázovacích dat pak bude tvořit i nerefázovací signál a obráceně. Efekt prosáknutí dat mezi refázovacími a nerefázovacími spektry je samozřejmě tím silnější, čím je excitační pulz delší v čase.

Při čtení 2D spekter je také potřeba mít na paměti tvar spektra excitačního laseru, se kterým byla daná data naměřena. Intenzita stop ve 2D spektrech je dána nejen vlastnostmi vzorku samotného, ale také podobou spektra LO. Má-li spektrum LO v nějakém místě nízkou intenzitu dochází zde k potlačení intenzity signálů a naopak. Vzorek sám o sobě by tak mohl v principu na dané vlnové délce poskytovat silný signál, ovšem nízká intenzita lokálního oscilátoru v tomto místě zapříčiní silné utlumení stopy v získaném 2D spektru. Naopak je-li na dané vlnové délce LO silný, může to vést k „vyzvednutí“ méně nápadného signálu. Tímto způsobem dochází k výraznému ovlivňování relativní intenzity stop v získávaných 2D spektrech. Důsledkem změny poměru intenzit peaků může být i „cestování“ jejich pozice v 2D spektru, což představuje velký problém zejména pro široké

---

<sup>1</sup>Snížení šumu ovšem není v případě našeho experimentu snadné. CCD kamera užívaná jako detektor je již chlazená a tedy její šum je již do značné míry potlačen. Dále by bylo samozřejmě možné průměrovat data přes větší počet měření, což ovšem nepřipadá v úvahu z časových důvodů.

peaky, u kterých je pak velmi nesnadné určit skutečnou polohu centra peaku. A bohužel právě takové peaky typicky vykazují vzorky fykobilizomů měřené v této práci.

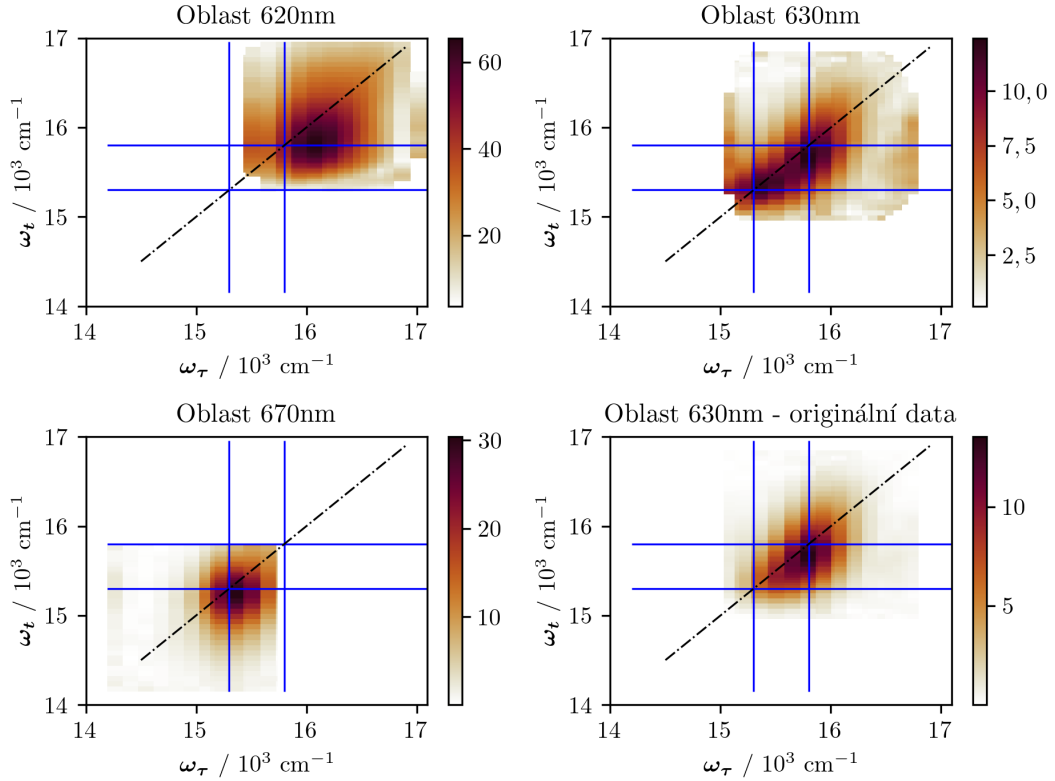
Při pohledu na přehledový graf zachycující polohy typických peaků (viz obrázek 4.15) je znatelné, že peaky z měření jednotlivých spektrálních oblastí (620, 630 a 670 nm) za pokojové teploty se neshodují. Tento efekt je zarážející, zvláště u dat na 620 a 630 nm, kde byla spektra LO do velké míry překryta (viz obrázek 4.1). Proto bylo, na základě úvah uvedených v odstavci výše, učiněno několik pokusů s úpravou naměřených dat a ukázalo se, že pokud se data po zpracování vydělí vhodně naškálovaným lokálním oscilátorem, dojde k překryvu peaku v datech ze spektrálních oblastí 630 a 670 nm, jak je ukázáno na obrázku 5.1, kde jsou zobrazena korigovaná data. Bohužel se tímto nevyřeší problém překryvu mezi oblastmi 620 a 630 nm, ale shoda se touto úpravou dat přeci jen zlepší. Z právě uvedeného vyplývá, že zpracování dat pravděpodobně není dokonalé a ne zcela správně koriguje data podle spektra lokálního oscilátoru, což je problém, jež je nutné do budoucna vyřešit (o tomto efektu se vždy předpokládalo, že je zanedbatelný; že tomu tak není bylo zjištěno až při dokončování magisterské práce a proto nebyla analýza a korekce tohoto efektu dále detailně rozpracována).

Data za pokojové teploty obsahují celou řadu neoscilujících komponent, jejichž hlavní peaky neleží na diagonále, jak by se dalo očekávat, ale těsně pod ní. Proč signály leží pod diagonálou a nikoliv na ní se bohužel nepodařilo jednoznačně prokázat. Nabízí se teoreticky možnost, že dochází k excitaci ze základního do excitovaného stavu, avšak následně se systém nevrací do základního stavu přímo, ale padá do vibračního stavu, protože pravděpodobnost přechodu z excitovaného stavu do vibrační hladiny je vyšší, než-li přímo přechod do základního stavu bez vibrace. Při měření za teploty kapalného dusíku na spektrální oblasti 630 nm se tento efekt ve spektrech neprojevuje a neoscilující signály leží přímo na diagonále, avšak kryje data na 675 nm obsahují neoscilující signály ležící opět pod diagonálou. To by znamenalo, že vlivem zchlazení vzorku dojde selektivně pouze u některých stavů ke změně pravděpodobnosti přechodu na různé vibrační hladiny elektronových stavů. Tato varianta se tak jeví poměrně nepravděpodobná.

Zdrojem posunu peaků ve spektru však nemusí být nutně vlastnost systému samotného, ale může se jednat i o artefakt vznikající při zpracování dat, jak bylo uvedeno výše, a je teoreticky možné, že správná korekce na spektrum LO by peaky v datech umístila skutečně na diagonálu. Nicméně toto se nezdá až tak pravděpodobné, protože diskutované peaky leží ve středech měřených 2D spekter a jsou tak LO pokryty poměrně dobře. Nabízí se však i jiná vysvětlení. Vzorek může například obsahovat více energetických hladin, jež jsou položeny těsně nad sebou a mezi nimiž dochází k přenosu excitační energie. Tento přenos se v DAS projeví jako pod-diagonální crosspeaky<sup>2</sup>, které mohou díky příspěvku své intenzity posunout střed široké stopy pozorované ve spektru blíže své pozici, tedy pod diagonálu. Toto vysvětlení se jeví jako zdaleka nejpravděpodobnější.

---

<sup>2</sup>Slovo je převzato z angličtiny. Zde užíváno pro signály ležící na průsečíku vertikální a horizontální čáry, jež každá procházejí jedním diagonálním peakem. Crosspeaky mohou být tedy buďto poddiagonální nebo naddiagonální.



Obrázek 5.1: Naměřená data v různých spektrálních oblastech po vydělení vhodně naškálovaným lokálním oscilátorem a srovnání s originálními daty v oblasti 630 nm. Ze srovnání korigovaných dat na 630 nm (pravý horní graf) a originálních dat na této oblasti (pravý dolní graf) je jasně vidět, jak silný je vliv korekce na peak v oblasti  $15400 \text{ cm}^{-1}$ . Modré pomocné čáry jsou ve všech grafech umístěny stejně a je jasně viditelné, že spodní peak v oblasti 630 nm je tentýž peak jako je v oblasti 670 nm. Na vodorovné ose každého grafu je vynesena excitační frekvence  $\omega_\tau$  a na svislé detekční  $\omega_t$ . Barevné panely znázorňují intenzitu signálu. V každém grafu je také čerchovanou čarou vyznačena diagonála.

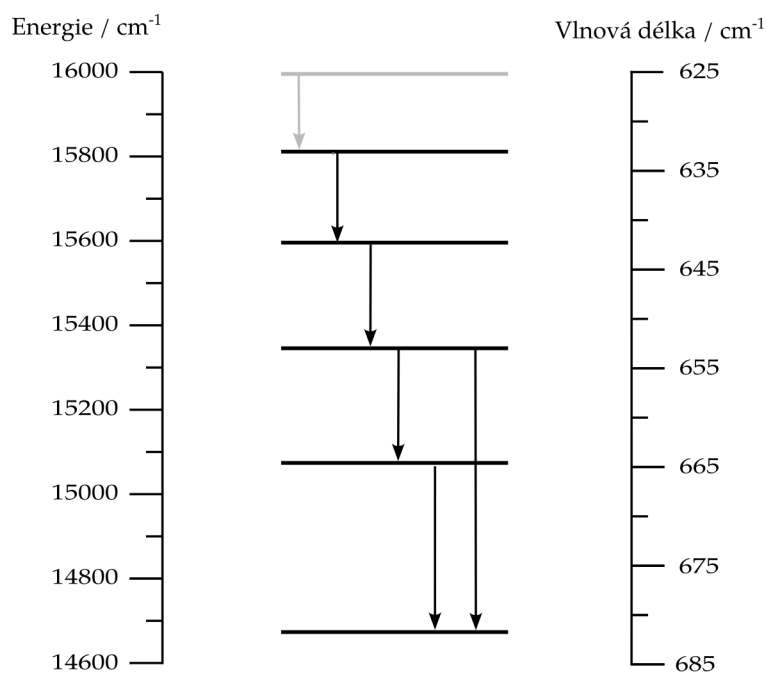
Jak je uvedeno v odstavci výše, zpracování dat pravděpodobně dobře nepostihuje tvar spektra měřícího laseru a peaky tak mohou mít jiné intenzity a dokonce i polohy (na vyvinutí správného postupu korekce dat na spektrum LO budeme pokračovat i po ukončení této magisterské práce). Tento artefakt vznikající při zpracování dat by mohl vysvětlovat, proč se nepodařilo jednoznačně určit interpretaci nalezených signálů. Dále je však také nutné brát v úvahu, že naměřená 2D spektra obsahují zpravidla velmi „široké“ signály (rozšířené jak ve smyslu excitační, tak detekční osy) a je tedy možné, že pozorovaný „jeden“ široký peak je ve skutečnosti tvořen celou řadou menších, ostřeji vymezených peaků, které však nejsme schopni rozlišit. Dále prezentovaný model energetických hladin a přenosů mezi nimi je proto pouhým návrhem, jež pochopitelně vychází ze změřených dat, ovšem tato data nepostačují k jeho potvrzení.

Na základě podob DAS, získaných při měření za pokojové teploty i teploty kapalného dusíku, byl sestaven návrh schématu elektronových hladin<sup>3</sup> a přenosů energie mezi nimi (viz obrázek 5.2). Nízkoteplotní data ve spektrální oblasti 675 nm (viz obrázek 4.12) zcela jasně ukazují na elektronovou hladinu na zhruba 14680 cm<sup>-1</sup>. V datech za pokojové teploty, ve spektrální oblasti 670 nm, tato hladina není přímo viditelná, ale komponenty s dobami života 36 ps a 1,1 ns vykazují crosspeak mezi stavem v okolí 15300 cm<sup>-1</sup> a nějakým stavem pod hranicí 14900 cm<sup>-1</sup> (viz obrázek 4.8). Dále jsou v nízkoteplotních datech na oblasti 675 nm vidět stavy na přibližně 15120 cm<sup>-1</sup> a 15340 cm<sup>-1</sup>. Na první pohled jsou signály těchto stavů slity do jedné stopy, ovšem nápaditý trojúhelníkovitý tvar této stopy svědčí o tom, že je složena ze dvou stavů, jež jsou spolu provázány přenosem energie. Obdobná situace panuje u dat za pokojové teploty v oblasti 670 nm, kde je pozorovatelná jedna velká stopa, ovšem její tvar a nefázovací spektrum komponenty s dobami života 109 fs a 5,5 ps prozrazují, že se pravděpodobně jedná o dva stavy, jež jsou provázány. Výše položený z obou právě diskutovaných stavů je vidět i v datech ze spektrální oblasti 630 nm a to jak v případě měření za pokojové teploty, tak v případě nízkoteplotních dat. Dále nízkoteplotní data na 630 nm (viz obrázek 4.10) obsahují informaci o stavech na přibližně 15650 cm<sup>-1</sup> a 15820 cm<sup>-1</sup>, kdy signály těchto stavů jsou opět slity do jedné stopy, ale její tvar ukazuje na to, že se jedná o dva stavy a že mezi nimi dochází k přenosu energie. Data za pokojové teploty, na spektrálním rozsahu kolem 630 nm (viz obrázek 4.5), vykazují stopy výrazně protáhlé v horizontálním směru a s přihlédnutím k podobě DAS komponenty s dobou života 70 fs lze tvrdit, že tato data ukazují na stavy v oblasti zhruba 15500 až 15800 cm<sup>-1</sup>, což je v přibližné shodě s nízkoteplotními daty. Kromě těchto komponent jde ovšem spekulovat i o výskytu výše položeného stavu, zhruba v oblasti 16000 cm<sup>-1</sup>. Tuto domněnku podporuje podoba dat ve spektrálních oblastech 620 nm (viz obrázek 4.3), která ukazuje na přítomnost nejméně jednoho stavu v oblasti nad 15800 cm<sup>-1</sup>.

Význam a původ oscilujících signálů se bohužel nepodařilo uspokojivě vysvětlit. Vzhledem k tomu, že tyto signály neleží na „mřížce“ tvořené peaky neoscilujících komponent, nejedná se pravděpodobně o elektronové koherence. Dále byla prošetřena možnost, že by se mohlo jednat o ramanův rozptyl. Ze srovnání změřených CAS s modelem (viz příloha A.1) však jasně vyplynulo, že nejde o signál ramanova rozptylu. Nabízí se vysvětlení, že se jedná o koherence zahrnující vibrační stavy, což se ovšem nepodařilo přesvědčivě potvrdit. Hlavní problém spočívá v rozlišení experimentu a frekvenci oscilace zmíněných signálů - tyto dvě hodnoty jsou totiž přibližně stejně velké (pro oscilace  $\pm 200$  cm<sup>-1</sup>), což velice komplikuje učinění jasných závěrů o původu těchto signálů. Pro přesné určení původu oscilujících signálů by bylo zapotřebí podrobnější analýzy dat, která by zahrnovala jak efekt ovlivnění pozice peaků podobou LO, tak vyhodnocení „promíchání“ refázovacích a nefázovacích signálů.

Jak již bylo komentováno výše a jak je znázorněno na energetickém schématu 5.2, byla pozorována celá řada přenosů excitační energie, tedy pod-diagonálních

<sup>3</sup>Nemusí se však jednat čistě o elektronový stav, ale může pochopitelně jít i o nějakou vibrační hladinu elektronové stavu. V tomto smyslu je označení „elektronová“ hladina užíváno i dále.



Obrázek 5.2: Schéma pozorovaných energetických hladin ve fykobilizomech *T. elongatus* a přenosu energie mezi nimi. Pro lepší orientaci je na levé straně uvedena osa v  $\text{cm}^{-1}$ , zatímco na pravé v nm. Celé schéma je pouze orientační a zachycuje kombinaci poznatků z měření za pokojové teploty i za teploty kapalného dusíku. Nejvýše položený stav a energetických přechod z něj jsou značeny šedou barvou, protože je téměř jisté, nad ostatními stavy je ještě další, ale není jisté kde přesně se nachází.

crosspeaků. V některých případech však byly pozorovány i komplementární nad-diagonální crosspeaky - kombinace nad- i pod-diagonálního crosspeaku ukazuje na možnou přítomnost excitonové interakce. V datech za pokojové teploty na rozsahu okolo 670 nm je u komponenty dobou života 5,5 ps náznak nad-diagonálního crosspeaku v nerefázovacím spektru a zároveň tvar déle žijících komponent ukazuje na možnost excitonové interakce se stavem, jež leží někde pod  $15000 \text{ cm}^{-1}$ . Další náznak excitonové interakce se nachází v nízkoteplotních datech na spektrálním rozsahu okolo 630 nm, kde komponenty s dobami života 2,5 a 46 ps ukazují možnou interakci mezi stavy na cca  $15400$  a  $15600 \text{ cm}^{-1}$ . I v nízkoteplotních datech na 675 nm je náznak excitonové interakce a sice v nerefázovacích spektrech mezi stavy na  $14670$  a  $15100 \text{ cm}^{-1}$ .

# Závěr

V rámci práce byly pomocí dvoudimentionální elektronové spektroskopie studovány fykobilizomy sinice *thermosynechococcus elongatus* ve spektrálním rozsahu přibližně 590 až 700 nm (z důvodu užšího spektra excitačního laseru byla celá zmíněná oblast proměřena v rámci 3 oddělených experimentů). Ukázalo se, že se jedná o komplikovaný vzorek, jež vykazuje velmi rychlou dekohorenci, což s sebou nese problém v podobě nízkého rozlišení měřených dat a špatné separovatelnosti refázovacích a nerefázovacích spekter. Kvůli těmto dvěma efektům byla velice ztížena interpretace získaných dat.

Problémy s interpretací dat, konkrétně s překryvem signálů z různých spektrálních oblastí, vedly k pokusům o korekci dat. Bylo zjištěno, že pokud jsou data vydělena vhodně naškálovaným spektrem lokálního oscilátoru, lze dojít v případě spektrálních oblastí 630 a 670 nm ke shodě v poloze neoscilujícího peaku a v případě dvojice oblastí 630 a 620 nm ke zlepšení shody. Tento poznatek vede k domněnce, že data nebyla zpracována zcela ideálně s ohledem na tvar spektra LO. Ke zjištění, že tento efekt není rozhodně zanedbatelný, došlo bohužel až na samém konci diplomové práce a z časových důvodů již nebylo možné rozpracovat korekci dat a zkorigovat veškerá data.

Ve změřených datech byla odhalena celá řada neoscilujících komponent. Ve 2D spektrech získaných měřeními za pokojové teploty neležely peaky těchto stavů přímo na diagonále, ale byly posunuty lehce pod ní. Tento efekt se bohužel nepodařilo zcela objasnit. Dá se nicméně předpokládat, že mohl být způsoben velkým množstvím crosspeaků značících přenos excitační energie. Dále byly pozorovány mimodiagonální signály s oscilacemi přibližně 200, -200 a -500  $\text{cm}^{-1}$  a to pro každou měřenou spektrální oblast. Tyto oscilující signály ovšem neleží v „mřížce“ (tedy nad / pod nebo vlevo / vpravo od signálu) vůči nalezeným neoscilujícím signálům, což značí, že se nejedná o elektronové koherence. Vzhledem k frekvencím posunů by se mohlo jednat o vibrační stavy, avšak tuto domněnku není možné na základně získaných dat potvrdit.

V datech, měřených za pokojové teploty i za teploty kapalného dusíku, bylo nalezeno 6 energetických hladin (přesněji byly nalezeny přibližné frekvence 5 stavů, šestý stav jistě existuje v oblasti přibližně 16000  $\text{cm}^{-1}$ , ale není možné jeho energii blíže určit) a byl odhalen přenos excitační energie mezi nimi - viz obrázek 5.2.

Analýza dat ukázala hned na několik možných excitonových interakcí. Zdá se, že excitonovou interakcí jsou svázány dvojice stavů ležící na 15400 a 14700  $\text{cm}^{-1}$ , dále na 15600 a 15400  $\text{cm}^{-1}$  a také na 15100 a 14670  $\text{cm}^{-1}$ . Naneštěstí však ze získaných dat není možné s jistotou říci, že se jedná právě o excitonovou interakci, i když se toto vysvětlení jeví jako pravděpodobné.



# Seznam použité literatury

- [1] Tobias Brixner, Tomáš Mančal, Igor V. Stiopkin, and Graham R. Fleming. Phase-stabilized two-dimensional electronic spectroscopy. *The Journal of Chemical Physics*, 121(9):4221–4236, 2004.
- [2] Elisabetta Collini. 2d electronic spectroscopic techniques for quantum technology applications. *The Journal of Physical Chemistry C*, 125(24):13096–13108, 2021. PMID: 34276867.
- [3] Somnath Biswas, JunWoo Kim, Xinzi Zhang, and Gregory D. Scholes. Coherent two-dimensional and broadband electronic spectroscopies. *Chemical Reviews*, 122(3):4257–4321, 2022. PMID: 35037757.
- [4] Darius Abramavicius, Benoit Palmieri, Dmitri V. Voronine, František Šanda, and Shaul Mukamel. Coherent multidimensional optical spectroscopy of excitons in molecular aggregates; quasiparticle versus supermolecule perspectives. *Chemical Reviews*, 109(6):2350–2408, 2009. PMID: 19432416.
- [5] S. Mukamel. *Principles of Nonlinear Optical Spectroscopy*. Oxford series in optical and imaging sciences. Oxford University Press, 1995.
- [6] Paul D. T. Huibers. Models for the wavelength dependence of the index of refraction of water. *Appl. Opt.*, 36(16):3785–3787, Jun 1997.
- [7] Andrea Volpato, Luca Bolzonello, Elena Meneghin, and Elisabetta Collini. Global analysis of coherence and population dynamics in 2d electronic spectroscopy. *Opt. Express*, 24(21):24773–24785, Oct 2016.
- [8] R.H. Kingston. *Optical Sources, Detectors, and Systems: Fundamentals and Applications*. Optics and photonics. ACADEMIC Press INC, 1995.
- [9] Ivo H.M. van Stokkum, Delmar S. Larsen, and Rienk van Grondelle. Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1657(2):82–104, 2004.
- [10] Karel Bouda, Anna Fucikova, Jakub Pšenčík, and Jan Alster. Solvent signals in two-dimensional electronic spectroscopy. *AIP Advances*, 12:115306, 11 2022.
- [11] Vytautas Butkus, Jan Alster, Eglė Bukartė, Ramūnas Augulis, Patrik Neuhaus, Leonas Valkunas, Harry Anderson, Darius Abramavicius, and Donatas Zigmantas. Discrimination of diverse coherences allows identification of electronic transitions of a molecular nanoring. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 8, 04 2017.
- [12] Yasukazu Nakamura, Takakazu Kaneko, Shusei Sato, Masahiko Ikeuchi, Hiroshi Katoh, Shigemi Sasamoto, Akiko Watanabe, Mayumi Iriguchi, Kumiko Kawashima, Takaharu Kimura, Yoshie Kishida, Chiaki Kiyokawa, Mitsuyo Kohara, Midori Matsumoto, Ai Matsuno, Naomi Nakazaki, Sayaka Shimpo, Masako Sugimoto, Chie Takeuchi, Manabu Yamada, and Satoshi Tabata.

- Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *thermosynechococcus elongatus* bp-1 (supplement). *DNA Research*, 9(4):135–148, 08 2002.
- [13] Niraj Kumar Singh, Ravi Raghav Sonani, Rajesh Prasad Rastogi, and Datta Madamwar. The phycobilisomes: an early requisite for efficient photosynthesis in cyanobacteria. *EXCLI journal*, 14:268, 2015.
- [14] Asha Parmar, Niraj Kumar Singh, Avani Kaushal, Sagar Sonawala, and Datta Madamwar. Purification, characterization and comparison of phycoerythrins from three different marine cyanobacterial cultures. *Bioresource Technology*, 102(2):1795–1802, 2011.
- [15] James William Murray, Karim Maghlaoui, and James Barber. The structure of allophycocyanin from *thermosynechococcus elongatus* at 3.5Å resolution. *Acta Crystallographica Section F*, 63(12):998–1002, Dec 2007.
- [16] James Murray, Karim Maghlaoui, and James Barber. The structure of allophycocyanin from *thermosynechococcus elongatus* at 3.5 Å resolution. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 63:998–1002, 01 2008.
- [17] J. Kern, B. Loll, C. Lüneberg, D. DiFiore, J. Biesiadka, K.-D. Irrgang, and A. Zouni. Purification, characterisation and crystallisation of photosystem ii from *thermosynechococcus elongatus* cultivated in a new type of photobioreactor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1706(1):147–157, 2005.
- [18] Jakub Dostál and Jan Alster. Interplay between coherence-time undersampling and scattered light in two-dimensional electronic spectroscopy. *Review of Scientific Instruments*, 91(9):093103, 2020.

# A. Přílohy

## A.1 Simulace ramanových spekter

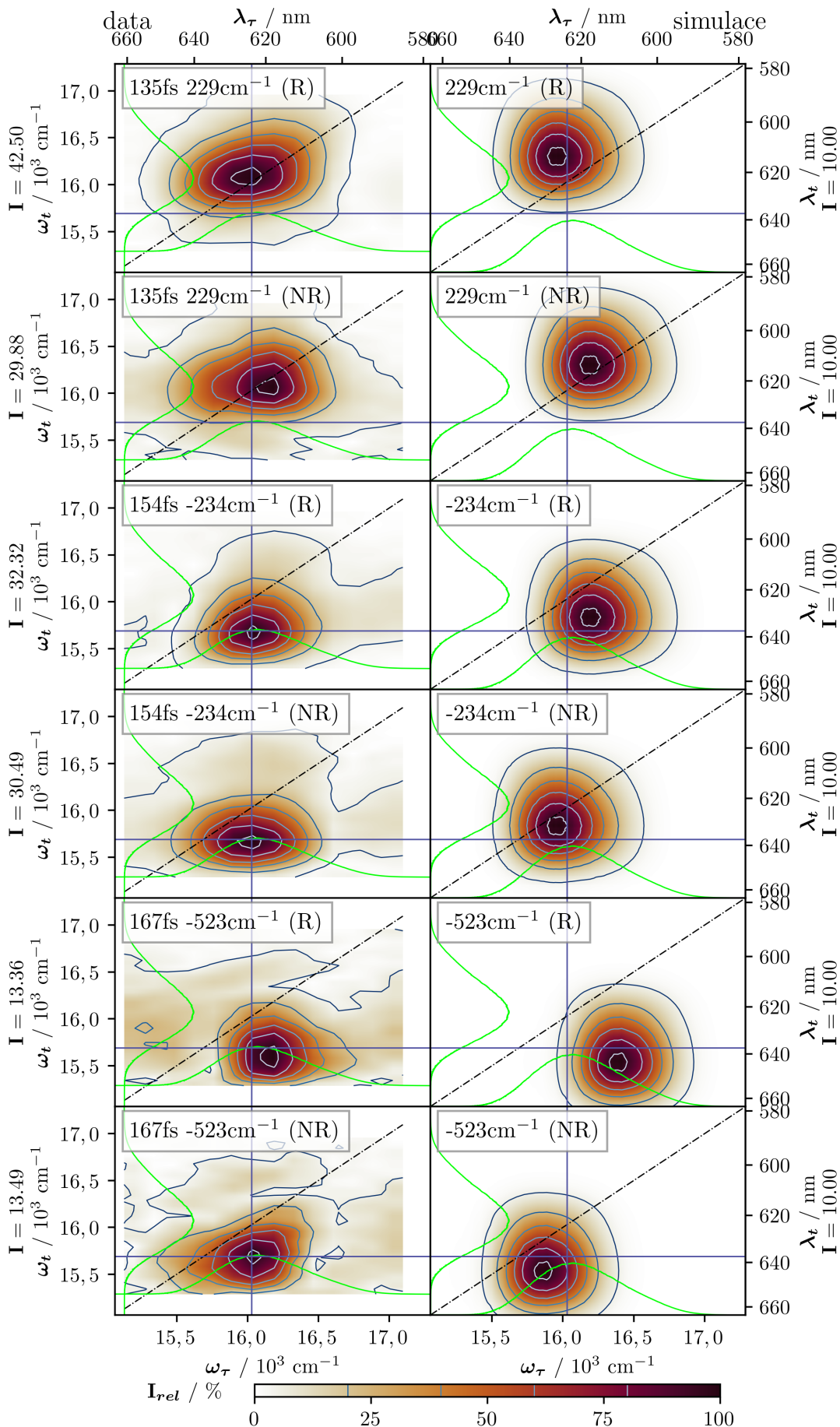
Všechna získaná CAS spektra byla srovnávána s nasimulovanými ramanovskými spektry. Simulace probíhala jednoduchým modelem navrženým v [10], tedy dle vztahu

$$R_{reph} \approx |E(\omega_1)||E(\omega_1 + \omega_2)||E(\omega_3 - \omega_2)| \quad (\text{A.1})$$

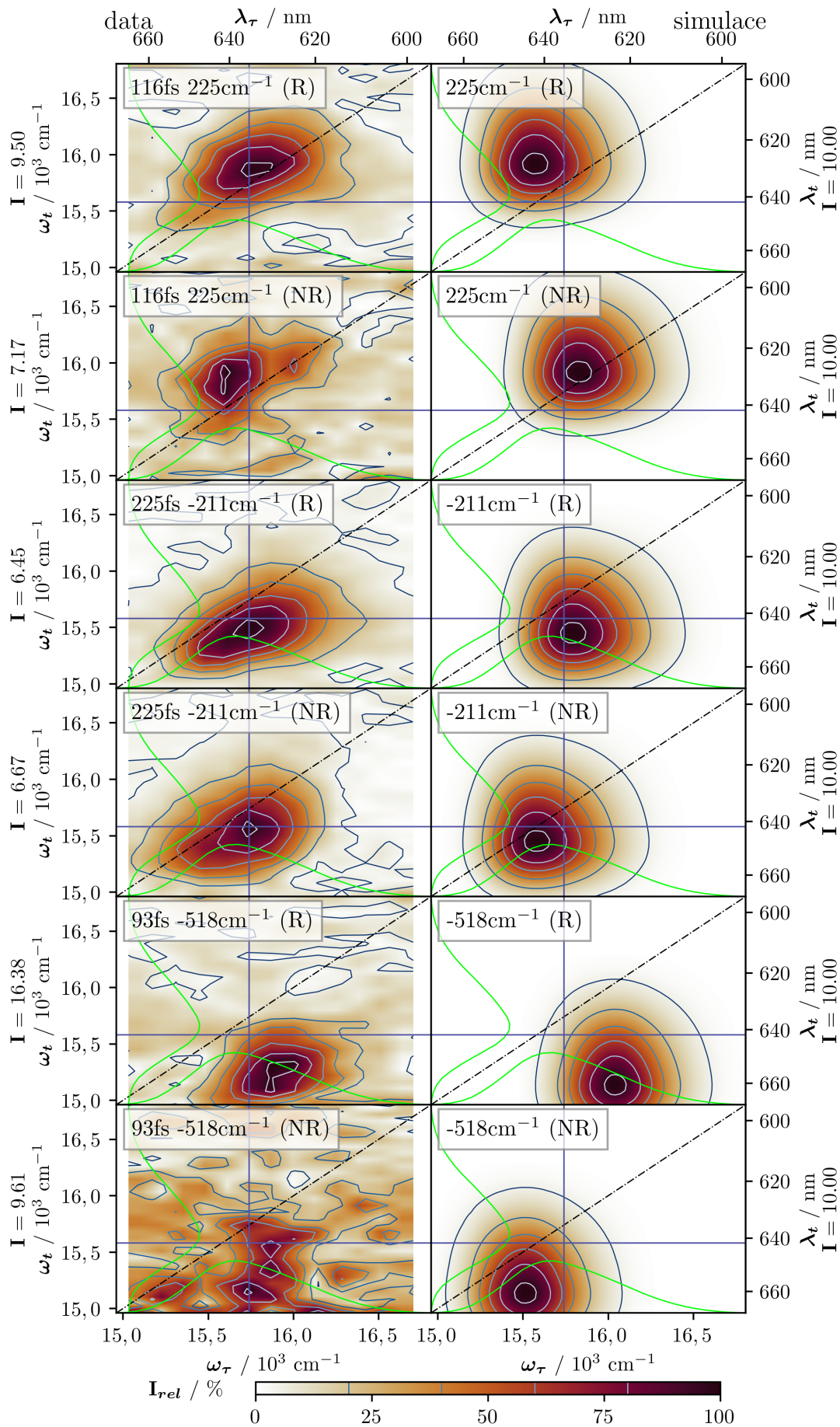
pro refázovací složku a pro nerefázovací dle

$$R_{nonreph} \approx |E(\omega_1)||E(\omega_1 - \omega_2)||E(\omega_3 - \omega_2)|. \quad (\text{A.2})$$

Níže je pro každou spektrální oblast (620, 630 s 670 nm) uvedeno srovnání CAS získaných z měřených dat (levý sloupec) a simulace (pravý sloupec) - viz obrázky A.1, A.2 a A.3. Ve všech zmíněných grafech jsou užity zkratky:  $R$  pro refázovací složku spektra,  $NR$  pro nerefázovací. Dále je v každém grafu u změřených dat uvedena doba života a frekvence oscilace, u simulovaných dat pouze frekvence. Grafy také obsahují zeleně vyznačené spektrum lokálního oscilátoru a čerchovanou čarou značenou diagonálu. Všechny grafy v jednom obrázku mají společnou barevnou relativní intenzitní osu - maximální hodnoty intenzit jsou vepsány ze strany grafů. Nicméně jednoduchý model užitý k simulaci dat neumožňuje porovnání absolutní hodnoty intenzit mezi simulací a daty, rozhodujícím faktorem je pouze tvar stopy ve 2D spektru.

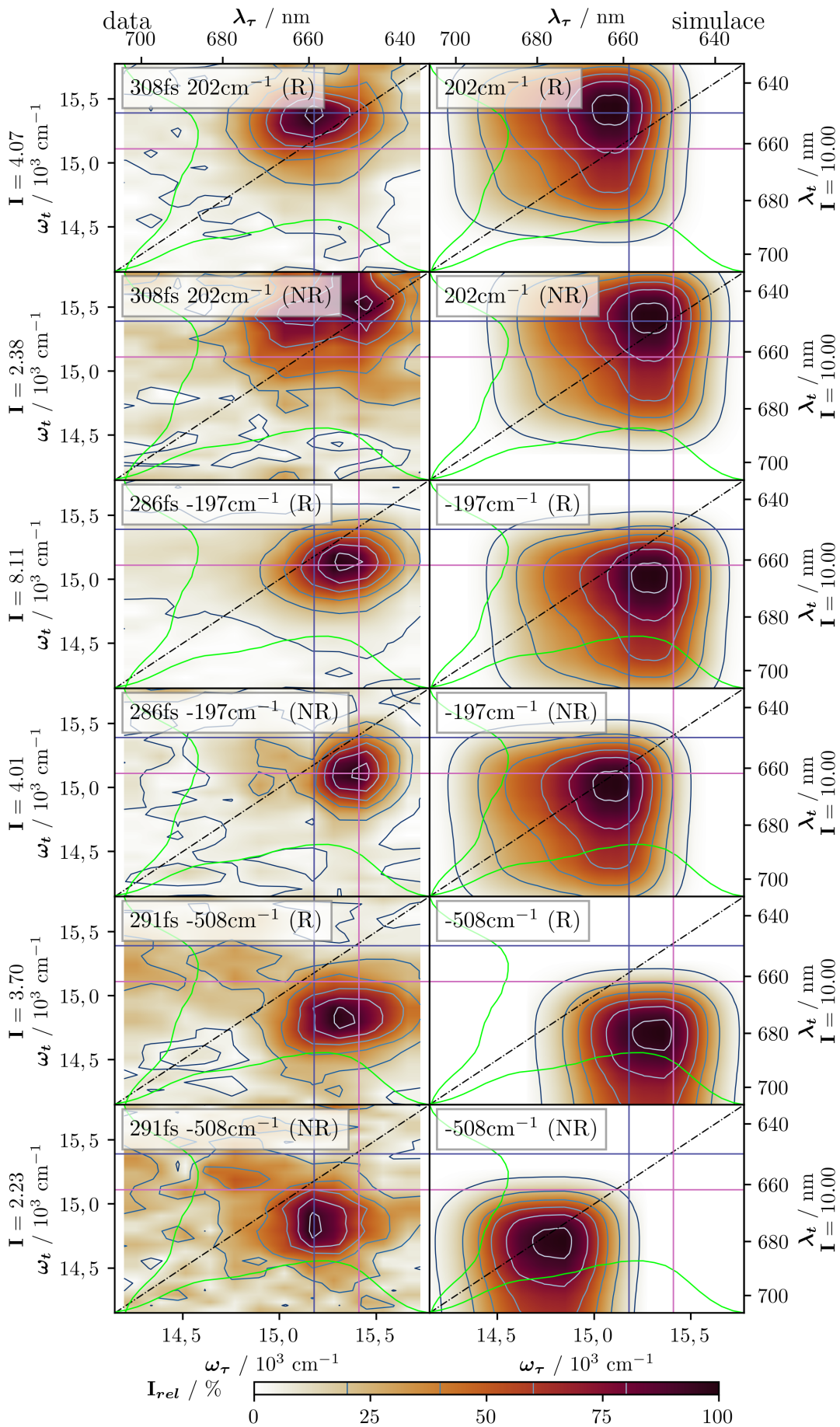


Obrázek A.1: Srovnání naměřených CAS a nasimulovaných ramanových spekter.



Obrázek A.2: Srovnání naměřených CAS a nasimulovaných ramanových spekter.





Obrázek A.3: Srovnání naměřených CAS a nasimulovaných ramanových spekter.